ASPOSTEROL, EIN ANTIBIOTIKUM AUS ASPERGILLUS MICROCYSTICUS UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLFGANG HEBERLE

aus Schwäbisch Gmünd

1974

71 137

ASPOSTEROL, EIN ANTIBIOTIKUM AUS ASPERGILLUS MICROCYSTICUS UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WOLFGANG HEBERLE

aus Schwäbisch Gmünd

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1974

D e k a n : Professor Dr. D. Sperlich

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Loeffler

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler am Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie I, der Universität Tübingen ausgeführt.

Den Herren Professoren Dr. H. Diekmann, Dr. W. Loeffler und Dr. H. Zähner gilt mein besonderer Dank für die Förderung der Arbeit und ihr ständiges Interesse.

Wertvolle Diskussionen und Ergebnisse ihrer Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Asposterols trugen die Herren Dr. H. Kneifel und Dr. W. König, Organisch Chemisches Laboratorium der Universität Tübingen, bei. Ihnen danke ich herzlich.

Allen Mitarbeitern der Lehrbereiche Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0062

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

ABTS	2.2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolon)-6'-sulfonat
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
d	Inkubationsdauer in Tagen
E_{546}	Extinktion bei 546 nm in einer Zelle mit der Dicke 1 cm
ETH	Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz
h	Inkubationsdauer in Stunden
rpm	Umdrehungen (revolutions) pro Minute
Tü	Institut für Biologie der Universität Tübingen, Lehrbereich Mikrobiologie
V. C.	Lebendkeimzahlbestimmung nach Ausplattieren auf Komplexmedium
v/v	Verhältnis von Volumenteilen

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Chemikalien	7
2.2. Nährmedien	9
2.3. Besondere Methoden für den Produzentenstamm	11
2.4. Teststämme	12
2.5. Mikrophotographie	13
2.6. Methoden zur Charakterisierung der antibiotischen Aktivität	14
2.7. Methoden zur Herstellung von Asposterol	14
2.8. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise	17
3. Ergebnisse	22
3.1. Charakterisierung des Produzenten	22
3.2. Herstellung des Antibiotikums	26
3.3. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums	31
3.4. Biologische Eigenschaften des Antibiotikums	41
3.5. Substanzen mit Asposterol-ähnlicher Wirkung	59
3.6. Der Einfluß von Asposterol auf die Phospholipase A in vitro	60
4. Diskussion	62
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	69

1. EINLEITUNG

In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit wurde bei einem Stamm der Species Aspergillus microcysticus Sappa (Tü 502) antibiotische Aktivität gefunden; vorher galt der Pilz nicht als Antibiotikabildner (HEBERLE 1972). Die volle Wirkung ließ sich mit der Anwesenheit eines einzigen, in zwei isomeren Formen vorliegenden Antibiotikums erklären, das den Namen Asposterol erhält (Aspo- = Kurzname der Produzentengattung, -sterol = Hinweis auf das Steroidgerüst der Verbindung).

Mit dem erstmaligen Nachweis eines Antibiotikums von Aspergillus microcysticus ist noch nichts über die Originalität des Wirkstoffes ausgesagt. Die Eigenschaften des Asposterols wurden etwa in der Reihenfolge, wie sie definiert werden konnten, zum Vergleich mit bereits beschriebenen Verbindungen herangezogen. Anfänglich standen nur wenige Merkmale zur Verfügung, unter ihnen die Artzugehörigkeit des Produzenten. Es zeigte sich, daß allein in der Gattung Aspergillus 50 der von RAPER & FENNELL (1965) unterschiedenen 150 Arten und Varietäten insgesamt 101 Antibiotika bilden, von denen 21 bei mehreren Aspergillus-Arten und 23 auch außerhalb des Genus nachgewiesen worden sind, die meisten davon, 14, in der nahestehenden Gattung Penicillium (Tab. 1). Daraus ist abzuleiten, daß "Aspergillus-Antibiotika" primär als Stoffwechselprodukte anderer Organismen beschrieben sein können.

Aspergillus und Penicillium sind Deuteromycetes (Fungi imperfecti), die als eng verwandt gelten. Manche Stämme und Arten bilden mit unterschiedlicher Regelmäßigkeit Hauptfruchtformen aus, und danach beurteilt, gehören jene Pilze - bisher ohne Ausnahme - zur Familie Eurotiaceae innerhalb der Ordnung Eurotiales (die von manchen Autoren unkorrekt als "Aspergillales" bezeichnet wird), und die

ihrerseits einen Teil der prototunicaten, echten Ascomycetes darstellt (MÜLLER & LOEFFLER 1971).

Die Gattungsnamen Aspergillus und Penicillium sind besser bekannt als die umfassenderen Gruppen, in die sie eingereiht werden (Moniliaceae, Moniliales), und auch besser als die Namen der in Frage kommenden Hauptfruchtformen (für Aspergillus: Emericella, Eurotium, Sartorya, für Penicillium: Carpenteles, Talaromyces).

Für Aspergillus microcysticus ist keine Hauptfruchtform nachgewiesen, verwandtschaftliche Beziehungen zu den Eurotiales sind aus Analogien hergeleitet.

Die weiteren, von chemotaxonomischen Überlegungen unabhängigen Überprüfungen lieferten unter anderem zusätzliche Informationen über Eigenschaften des Asposterols und sind im Verlaufe der Darstellung später zu erwähnen. Sie stützen ebenfalls die Annahme, eine Verbindung mit den Eigenschaften des Antibiotikums sei in der Literatur noch nicht beschrieben. Mehr Sicherheit hinsichtlich der Originalität des Asposterols wurde allerdings erst erhalten, nachdem ausreichende chemische und physikalische Daten verfügbar waren.

Die wesentliche Aufgabe der Arbeit, über die hier zu berichten ist, bestand in der Herstellung, Reinigung und Charakterisierung des Asposterols. Außerdem sollte versucht werden, Aufschlüsse über die Wirkungsweise des Antibiotikums zu erhalten.

Tab. 1: Die Antibiotika der Gattung Aspergillus[1)]

Antibiotikum	Wirkungsspektrum										Produzentenspektrum					
	Gram + Bakt.	Gram - Bakt.	Pilze	Viren, Phagen	Protozoen	Tumorzellen	Pflanzen	Insekten	Würmer		Aspergillus[2)]	Penicillium	Sonst. Pilze	Streptomyces	Sonst. Bakt.	Höh. Pflanzen
Spalte	a	b	c	d	e	f	g	h	i		j	k	l	m	n	o
A-32204/B (NYFELER 1973)			+								1					
Acetylaranotin (Antibioticum LL-S 88 α)				+							1		+			
4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methylisocumarin			+								1					
Aflatoxin B_1	+		+								2	+				
Alpha Sarcin			+								1					
1-Amino-2-nitrocyclopentancarboxylsäure							+				1					
Amodin A	+										1					
Amodin B	+	+	+								1					
Antibioticum:																
LL-S-491 ß (ELLESTAD et al. 1972)	+				+						1					
LL-S-491 δ (ELLESTAD et al. 1972)				+	+						1					
MM. 4086								+			1					
No. 6						+					1					
Antibiotikum aus:																
A. chevalieri	+	+									1					
A. flaschentraegeri			+								1					
A. flavus (SANCHEZ 1956)			+								1					
A. flavus-oryzae	+	+									1					
A. fumigatus	+	+		+							1					

[1)] Die wichtigsten Eigenschaften der Antibiotika, die hier ohne Literaturzitat stehen, sind bei HEBERLE (1972) aufgeführt.

[2)] Zahl der Produzenten (Species und Varietäten) in der Gattung Aspergillus.

(Tab. 1, Fortsetzung)

Antibiotikum	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
Antibiotikum aus:															
A. giganteus (HULS et al. 1957)	+									1					
A. japonicus			+							1					
A. melleus	+									1					
A. niger				+						1					
A. niger (TEDESCHI 1948)					+					1					
A. repens und A. ruber	+									2					
A. terreus			+							1					
A. terricola	+	+								1					
A. wentii (BLINC & JOHANIDES 1956)	+	+								1					
Aspergillin	+	+			+					1					
Aspergillomarasmin A und B (Lyco-marasmin und -säure)							+			1					
Aspergillsäure	+	+	+							2					
Aspergin	+	+								2					
Asperginon (SOKOLOV et al. 1972)			+							1					
Asperlin (Antibioticum U-13,933)	+	+	+							1		+			
Aspochracein								+		1					
Athlestatin			+							1					
A. U. N.-1, 2 und 3	+	+								1					
Aurantidin	+	+								1					
Avenaciolid			+							1					
Bisdethiodi(methylthio)acetylaranotin (Antibioticum LL-S 88 ß, BDA)				+						1		+			
Canadensolide (McCORKINDALE et al. 1968)			+							1	+				
Candidulin	+		+							1					
Canescin			+							1	+				
Chlorflavonin			+							1					
Citrinin (Notalin)	+		+		+					2	+				+
Cordycepin (3'-Desoxyadenosin)	+				+	+				1		+			
Dechloronornidulin	+									1					
Destruxin B (TAMURA et al. 1964)								+		1		+			

(Tab. 1, Fortsetzung)

Antibiotikum	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
Endocrocin (Clavoxanthin)	+	+								1	+	+			+
Flavacol	+	+								2					
Flavicidinsäure (HUMMEL 1956)							+			1					
Flavipin	+		+							2					
Flavipucin (FINDLAY & RADICS 1972)	+	+								1					
Fumagillin (Amebacilin, Antibioticum H-3, Fugillin, Fumidil, Fumogilin, Phagopedin sigma)	+	+	+	+	+					1					
Fumigachlorin			+							2					
Fumigatin	+	+								2	+				
Funginon	+	+	+			+				1					
Geodin	+									1					
Geodin-ähnliches Antibiotikum	+									1					
Gigantin		+								1					
Gliotoxin	+	+	+	+						2	+	+			
Granegillin (Granigellin)		+								3					
Helvolsäure (Fumigacin, Mycoidin)	+									1		+			
Humicolin			+							1					
Hydroxyaspergillsäure	+	+	+							2					
4-Isoavenaciolid (ALDRIDGE & TURNER 1971)			+							1					
Kojisäure	+	+	+					+		18	+			+	
Luchensin	+	+	+							1					
Malformin A							+			4					
Mellein (Ochracin)	+	+								2		+			
Methoxyxanthocillin-X-dimethyläther	+			+						1					
Mutaaspergillsäure	+									1					
Mycocidin	+									1					
Neoaspergillsäure	+	+	+							1					
Neohydroxyaspergillsäure	+	+	+	+						1					
Nidulin	+		+							1					
ß-Nitropropionsäure (BNPA, Bovinocidin, Hiptagensäure)	+									4	+		+		+

(Tab. 1, Fortsetzung)

Antibiotikum	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
Nornidulin (Ustin)	+									1					
Oryzachlorin			+	+						1					
Oryzacidin (Oryzasizin)	+									1					
Patulin (Clavacin, Clavatin, Claviformin, Expansin, Leucopin, Mycoin, Mycoin C, Penicidin, Tercinin)	+	+	+		+		+			3	+	+			
Penicillin F, G, K, X (Flavacidin, Flavacin, Flavatin, Flavicidin, Flavicin, Gigantsäure, Parasiticin)	+									7	+	+			
Penicillinähnliches Antibiotikum	+									1					
Penicillinsäure	+	+	+						+	4	+				
Proliferin	+									1					
Quadrilineatin	+	+	+							1					
Regulin						+				1					
Restrictocin						+				1					
Spinulosin (6-Hydroxyfumigatin)	+	+								1	+				
"Stamm 70 Kristalle"			+							1					
Sterigmatocystin	+									5	+				
Tenuazonsäure				+		+				1		+			
Terrecin	+	+								1					
Terrein	+	+								2					
Terreinsäure	+	+	+		+					1					
Trypacidin					+					1					
Variecolin	+									1					
Velutinin			+							1					
Versicolin			+							1					
Versimid (BROWN 1970)								+		1					
Xanthocillin-X-dimethyläther	+			+						1					
Xanthocillin-X-methyläther	+			+						1		+			

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien[1)]

Für Versuche benutzte, im folgenden Verzeichnis aber nicht genannte Präparate waren entweder analysenreine Chemikalien der Firma E. Merck AG, Darmstadt, oder L-Aminosäuren von Calbiochem, Los Angeles, USA (A grade).

Äthylacetat, chem. rein, zur Herstellung von Rohextrakten (8)
Arachidonsäure (12)
2.2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolon)-6'-sulfonat (ABTS), kristallines Diammoniumsalz (1)
Bacto-Agar (6)
Bacto-Casamino Acids, Vitamin Free (6)
Bacto-Malt Extract (6)
Bacto-Yeast Extract (6)
Calciumsulfat (Sikkon), Körnung 3-5 mm (7)
Cardiolipin, äthanolische Lösung des Na-Salzes (12)
ß-Carotin, synthetisch, für biochemische Zwecke (9)
Cholesterin, für biochemische Zwecke (9)
Cholsäure (9)
DC-Alufolien mit Kieselgel F 254, Schichtdicke 0,25 mm (9)
Desoxycholsäure (9)

[1)] Herkunft (Hersteller):
1 = Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
2 = Brenntag GmbH, Mülheim/Ruhr
3 = Carl Roth OHG, Karlsruhe-West
4 = Deutsche Maizena Werke GmbH, Hamburg
5 = Deutsche Nestlé Gesellschaft mbH, Lindau (Bodensee)
6 = Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
7 = Fluka AG, Buchs SG, Schweiz
8 = A. Hedinger, Stuttgart
9 = E. Merck AG, Darmstadt
10 = Oxoid Ltd., London, U. K.
11 = Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg
12 = Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., USA
13 = Süddeutsche Zuckeraktiengesellschaft, Mannheim

1,2- und 1,3-Dipalmitinsäure (12)
Ergosterin, purum (7)
D-Glucose (Dextropurmonohydrat) (4)
Glucose-Oxydase (GOD), ca. 70 U/mg (1)
Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blau Gel) (9)
Kieselgel 60 für Säulen-Chromatographie:
0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) (9)
Kollektion Vitamine für chromatographische Vergleichszwecke (9)
Lab Lemco Powder (10)
DL-α-Lecithin (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin), synthetisch, grade I, cryst. (12)
L-α-Lecithin aus Eigelb (12)
Linolensäure (7)
Linolsäure, für biochemische Zwecke (9)
Niax Polyol 2600 (2)
Ölsäure, für biochemische Zwecke (9)
Östradiol, " (9)
Östriol, " (9)
Ostron, " (9)
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (9)
Peroxydase (POD), ca. 50 U/mg (1)
Phospholipase A (Crotalus terrificus terrificus), ca. 200 U/mg, Lösung in 50 % Glycerin (1)
Saccharose, S-Raffinade (13)
Stearinsäure, 99 %, puriss. (3)
Stigmasterin, purum (3)
Taurocholsäure, Na-Salz, für biochemische Zwecke (9)
DL-α-Tocopherol, für biochemische Zwecke (9)
DL-α-Tocopherol-Acetat (9)
DL-α-Tocopherylphosphat-Na_2-Salz, rein (11)
Trockenmagermilch (Molico Instant) (5)

Tween 80, rein (11)
Undecen-(10)-säure (Undecylensäure) (9)
Vitamin A-Alkohol, puriss., cryst. (7)
Vitamin K_1, purum (7)

2.2. Nährmedien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden die Medien 20 Minuten bei 121° C autoklaviert.

2.2.1. Medien zur Bestimmung und Pflege des Produzenten sowie für die Pilze des Wirkungsspektrums

Czapek-Dox-Agar (RAPER & FENNELL 1965):
30 g Saccharose, 3 g $NaNO_3$, 1 g K_2HPO_4, 500 mg $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 500 mg KCl, 10 mg $FeSO_4 \times 7\ H_2O$, 15 g Agar, 1 l entionisiertes Wasser (gemessen: pH 4,3 vor dem Autoklavieren).

Hefeagar:
4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 4 g Glucose, 20 g Agar, entionisiertes Wasser ad 1 l (gemessen: pH 5,5 vor dem Autoklavieren).

Malzagar:
20 g Malzextrakt, 20 g Agar, entionisiertes Wasser ad 1 l (gemessen: pH 6,0 vor dem Autoklavieren).

2.2.2. Medien für Submerskulturen des Produzenten

Raulin-Thom-Lösung (RAISTRICK & RUDMAN 1956):
75 g Glucose, 4 g L(+)-Weinsäure, 4 g Diammonium-D-tartrat, 600 mg $(NH_4)_2HPO_4$, 250 mg $(NH_4)_2SO_4$, 600 mg K_2CO_3, 500 mg Magnesiumhydroxidcarbonat, 70 mg $FeSO_4 \times 7\ H_2O$, 70 mg $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 1,5 l entionisiertes Wasser (gemessen: pH 3,7 vor und nach dem Sterilisieren).

Modifizierte Raulin-Thom-Lösung (Produktionsmedium für Asposterol):

50 g Glucose, 3 g L(+)-Weinsäure, 3 g Diammonium-D-tartrat, 400 mg $(NH_4)_2HPO_4$, 400 mg K_2CO_3, 300 mg Magnesiumhydroxidcarbonat, 50 mg $FeSO_4 \times 7\ H_2O$, 50 mg $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 1 l entionisiertes Wasser (gemessen: pH 3,7 vor und nach dem Sterilisieren).

2.2.3. Medien für Agardiffusionstests bei Bakterien

Tartratagar für Bacillus subtilis:
8 g Glucose, 4 g Diammonium-D-tartrat, 5 g NaCl, 2 g K_2HPO_4, 1 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 200 mg $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 10 mg $MnSO_4 \times 7\ H_2O$, 20 g Agar, entionisiertes Wasser ad 1 l (eingestellt: pH 7,3 vor dem Autoklavieren).

Nähragar für Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Streptomyces viridochromogenes:
3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton aus Casein, 2,5 g NaCl, 20 g Agar, entionisiertes Wasser ad 1 l (eingestellt: pH 7,3 vor dem Autoklavieren).

Komplexmedium für Clostridium pasteurianum:
3 g Fleischextrakt, 3 g Malzextrakt, 3 g Hefeextrakt, 20 g Pepton aus Casein, 5 g Glucose, 200 mg Ascorbinsäure, 1 g Agar, 1 l entionisiertes Wasser.

2.2.4. Medien für Submerskulturen der Testorganismen

Chemisch definiertes Medium für Bacillus subtilis (DAVIS & MINGIOLI 1950, modifiziert):
2 g Glucose, 3 g KH_2PO_4, 9,1 g $K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$, 100 mg $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, entionisiertes Wasser ad 1 l (gemessen: pH 7,0 vor und nach dem Autoklavieren).

Edinburgh Minimal Medium No 2 (EMM 2) für Schizosaccharomyces pombe (MITCHISON 1970):
10 g Glucose, 5 g NH_4Cl, 300 mg NaH_2PO_4, 1 g Natriumacetat, 1 g KCl, 500 mg $MgCl_2$, 10 mg Na_2SO_4, 10 mg $CaCl_2$, 10 mg meso-Inosit, 10 mg Nicotinsäure, 1 mg Calcium-D(+)-panto-

thenat, 10 µg D(+)-Biotin, entionisiertes Wasser ad 1 l (gemessen: pH 5,5 vor dem Autoklavieren).

Komplexmedium für Bacillus subtilis:
3 g Fleischextrakt, 5 g Pepton aus Casein, 2,5 g NaCl, entionisiertes Wasser ad 1 l (eingestellt: pH 7,3 vor dem Autoklavieren).

Komplexmedium für Schizosaccharomyces pombe:
4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 4 g Glucose, entionisiertes Wasser ad 1 l (gemessen: pH 5,5 vor dem Autoklavieren).

2.3. Besondere Methoden für den Produzentenstamm

2.3.1. Bestimmung und Pflege des Stammes Tü 502

Die Bestimmung des Stammes Tü 502 erfolgte nach den Vorschriften von RAPER & FENNELL (1965). Zur Stammhaltung wurde eine Konidiensuspension (2.3.2.) in Magermilch hergestellt (10 g Trockenmagermilch und 90 ml Wasser) und in 0,2 ml-Portionen lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage GT 2 der Firma Leybold-Heraeus GmbH & Co., KG, Köln). Anschließend wurden die Röhrchen unter Vakuum abgeschmolzen (ca. 0,5 Torr) und bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt.

2.3.2. Gewinnung einer Konidiensuspension von Tü 502

Reagenzgläser mit jeweils 5 ml Hefeagar (Schrägschicht im Reagenzglas) wurden mit Tü 502 beimpft (Lyophilisat) und zwei Wochen bei 27° C inkubiert. Anschließend wurde in jedes Kulturröhrchen 5 ml entionisiertes Wasser pipettiert. Durch vorsichtiges Schütteln der Kulturröhrchen konnten die Konidien in Suspension gebracht werden. Nach Vereinigen der Suspensionen (Titer: 9×10^{7}) wurde zum Animpfen von jeweils 100 ml Nährlösung 1 ml Konidiensuspension verwendet.

2.4. Teststämme

Die verzeichneten Stämme wurden zur Ermittlung des Wirkungsspektrums (3.4.1.), Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe außerdem für Untersuchungen zur Wirkungsweise des Asposterols (2.8.), benutzt (in Klammern sind die Kulturbedingungen angegeben, vgl. 2.2.).

2.4.1. Bakterienstämme

E u b a c t e r i a l e s

Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051 (16 h bei 37° C)

Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013 (24 h bei 30° C)

Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12 - Stamm W 945 Köln (20 h bei 37° C)

Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12 - Stamm W 945 Po 8 H - BECK 1973 (20 h bei 37° C)

Staphylococcus aureus Rosenbach - Tü 202 (18 h bei 37° C)

A c t i n o m y c e t a l e s

Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici - Tü 57 = ETH 23575 (24 h bei 27° C)

2.4.2. Pilzstämme

O o m y c e t e s

Pythium debaryanum Hesse - CBS 114.19[1] (3 d bei 27° C)[2]

Z y g o m y c e t e s

Mucor hiemalis Wehmer - (+) Tü 179 x (-) Tü 180 (24 h bei 27° C)

Mucor miehei Cooney et Emerson - Tü 284 (24 h bei 37° C)

A s c o m y c e t e s (und zugehörige Deuteromycetes)

Botrytis cinerea Persoon ex Fr. - Tü 157 (3 d bei 24° C)[2]

---

[1]) Ich danke Frau Ph. D. E. Sander für die Überlassung der Stämme

[2]) Test an der Riesenkolonie (LOEFFLER 1970)

Candida albicans (Robin) Berkhout - Tü 164 (24 h bei 27° C)
Cercospora beticola Saccardo - CBS 152.52[1] (7 d bei 27° C)[2]
Paecilomyces variotii Bainier - Tü 137 = ETH M 4646 (24 h bei 37° C)
Rhizoctonia solani Kühn - CBS 325.47[1] (3 d bei 27° C)[2]
Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125 (24 h bei 27° C)
Schizosaccharomyces pombe Lindner - (-) Tü 501 (24 h bei 27° C)
Sclerotinia fructigena (Persoon) Schroeter - CBS 350.49[1] (7 d bei 27° C)[2]
Thielaviopsis basicola (Berkeley et Broome) Ferraris - CBS 413.52[1] (3 d bei 27° C)[2]
B a s i d i o m y c e t e s (eine zugehörige Species der Deuteromycetes)
Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison var. dairenensis Hasegawa et Banno - CBS 4406 (24 h bei 27° C)

2.5. Mikrophotographie

Einbettung der Präparate:
Aspergillus microcysticus - Milchsäure
Schizosaccharomyces pombe (Protoplasten) - 0,8 M Glycerin (wässrig)

Aufnahmebedingungen:
Photomikroskop II (Zeiss)
Interferenzkontrast-Einrichtung nach Nomarski (KAGE 1973)
Objektiv: Planachromat 100/1,25 Oel (Zeiss)
Einstellung: Optovar 1,25; Projektiv 3,2
Film: 15 DIN (Agfa Isopan IFF).

---

[1]) und [2]) siehe vorhergehende Seite

2.6. Methoden zur Charakterisierung der antibiotischen Aktivität

2.6.1. Submerskulturen der Testorganismen

Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe wurden in Erlenmeyerkolben (500 ml) mit einem seitlichen Einstich ("Schikane") und jeweils 100 ml chemisch definierten Mediums angezogen, indem die Kulturen bei 27° C (Schizosaccharomyces pombe) bzw. 37° C (Bacillus subtilis) auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 rpm, Bewegungsradius: 25 mm) inkubiert wurden.

2.6.2. Agardiffusions-, Kreuz- und Streifengradiententest

Die Vorbereitung der Testplatten für den Agardiffusionstest bei Bakterien und Pilzen erfolgte in gleicher Weise wie bei WOLF (1971). Die Testanordnung für Clostridium pasteurianum ist bei KUNZE (1972) beschrieben[1]. Der Kreuz- und Streifengradiententest wurde wie bei HÜTTLIN (1972) ausgeführt.

2.7. Methoden zur Herstellung von Asposterol

Allgemeine Bedingungen für Submerskulturen: Modifizierte Nährlösung nach Raulin-Thom (2.2.2.), Inkubationstemperatur 27° C, Stamm Tü 502.

2.7.1. Fermentation

2.7.1.1. Impfmaterial für 10 l-Fermentationen

Erlenmeyerkolben (500 ml, ohne seitlichen Einstich) mit je 200 ml Nährlösung, nach dem Sterilisieren beimpft

[1]) Ich danke Frau T. L. Santo für die Durchführung des Tests

mit je 2 ml Konidiensuspension, werden 48 Stunden lang auf einer rotierenden Schüttelmaschine (RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz; 120 rpm, Bewegungsradius: 25 mm) inkubiert. 5 Kulturen (1 l) werden zum Beimpfen von 10 l-Ansätzen (2.7.1.2., 2.7.1.3.) benutzt.

2.7.1.2. 10 l-Vorkultur

10 l Nährlösung im Gefäß des Fermenters (MF-14, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N. J., USA) werden nach dem Autoklavieren (120° C, 30 Min.), Abkühlen und Beimpfen (2.7.1.1.) 48 Stunden lang bei 100 rpm unter Belüftung (2 l Luft/Min.) inkubiert.

2.7.1.3. 10 l-Fermentation

Sind 10 l-Ansätze nicht als Vorkulturen (2.7.1.2.), sondern zur Asposterol-Produktion vorgesehen, so erwiesen sich die folgenden abweichenden Bedingungen als günstig: 350 rpm, Luft: 6 l/Min., Inkubationszeit: ca. 33 Stunden.

2.7.1.4. 200 l-Fermentation

180 l Nährlösung im Gefäß des Fermenters (b 200, AG für Biologische Verfahrenstechnik, Basel, Schweiz; Fabrikation und Verkauf: Giovanola Frères SA, Monthey, Schweiz) werden nach dem Sterilisieren (120° C, 30 Min.), Abkühlen und Beimpfen mit 20 l Inoculum (2.7.1.2.) 33 Stunden lang unter folgenden Bedingungen inkubiert: Bei 1200 rpm (Umwurfsystem) werden 5000 l Luft/Stunde in die Kulturflüssigkeit eingeleitet. Schaumentwicklung wird durch wiederholte Zugabe einiger Tropfen Polyol (50 %, in Äthanol, nach ca. 25 Stunden) verhindert.

2.7.2. Fermentationsanalyse

Zur Darstellung des Fermentationsverlaufs wurde ein typischer Ansatz (2.7.1.3.) in drei Parallelen ausgewertet. Während der über die günstige Zeit für die Asposterol-Produktion ausgedehnten (66 stündigen) Inkubation wurden je Fermenter zehn Proben zur Bestimmung folgender Werte entnommen:

Asposterol-Konzentration - mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 7),

pH (Labor-pH-Meter: pH 70, Knick, Berlin),

Glucose-Konzentration - enzymatisch mit Glucose-Oxydase-Peroxydase-ABTS (BERGMEYER 1970),

Myzelvolumen - durch Zentrifugation (Christ II KS, 20^{o} C, 3090 rpm = 14900 g, 20 Min.) von Aliquoten in graduierten Gläschen (Hämatokriten) ermittelt, Angabe in Prozent Zentrifugat (MANDELS 1965).

2.7.3. Aufarbeitung

2.7.3.1. Gewinnung des Rohextrakts

Zur Trennung der Kulturflüssigkeit vom Myzel stand eine Filterpresse (Schenk, Schwäbisch Gmünd, mit Filterschichten C-150: 40 x 40 cm) zur Verfügung. Das Myzel-Waschwasser wurde mit dem Kulturfiltrat vereinigt und mit verdünnter NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Mit Äthylacetat (je 10 % des Kulturfiltrats, v/v) mußte je nach Wirksamkeit der Extraktionseinrichtung ein- bis dreimal extrahiert werden. Der Rohextrakt wurde zunächst auf ca. 500 ml und nach Wasserentzug ($CaSO_4$ über Nacht, $+4^{o}$ C) zur Trockne eingeengt.

2.7.3.2. Petrolätherbehandlung

Der Rohextrakt wurde in wenig Äthylacetat aufgenommen und die Lösung unter Rühren sukzessiv mit Petroläther versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Die Fällung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Verhältnis Äthylacetat : Petroläther war nach beendeter Fällung 1 : 10-15 (v/v). Nach zweimaligem Waschen des Niederschlags mit wenig Petroläther und Zentrifugieren wurden die drei Überstände vereinigt und am Vakuum zur Trockne eingeengt (Zentrifugat verworfen).

2.7.3.3. Säulen-Chromatographie

Die Auftrennung an Kieselgel (HESSE 1968) wurde in Chromatographiesäulen (50 x 3 cm) ausgeführt. Eine Suspension von 100 g Kieselgel in 300 ml Benzol wurde nach Entgasen durch Evakuieren in die Säule gegossen. Nachdem die Lösung des aufzutrennenden Präparates (2.7.3.2.) in wenig Benzol auf die Säule gebracht worden war, wurde die Durchflußgeschwindigkeit auf 100 Tropfen pro Minute eingestellt.

2.8. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise

2.8.1. Versuche mit dem Biophotometer

Die Versuche mit dem Biophotometer (Réf. 1520; Jouan, Paris) wurden in der von PORALLA (1967) beschriebenen Anordnung ausgeführt. Die Küvetten wurden jeweils mit 7 ml Zellsuspension beschickt (2.6.1., log-Phase), Bacillus subtilis bei 37° C, Schizosaccharomyces pombe bei 27° C inkubiert. Die Präparate waren in maximal

10 µl Äthanol gelöst und zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten A, B und C zugefügt worden. Bei beiden Testorganismen wurde mit einer Extinktion von E_{546} = 0,050 gestartet, und die Transmissionsmessung im Biophotometer willkürlich auf 95 % abgeglichen. Die Korrelation zwischen Transmission (Messung des Biophotometers), Extinktion (Messung im Eppendorf-Photometer bei 546 nm), sowie der Lebendkeimzahl (V. C., Ausplattieren) ist für Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe in Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2: Korrelation zwischen Transmission, Extinktion und Lebendkeimzahl für 1. Bacillus subtilis und 2. Schizosaccharomyces pombe

Zeit[1)]		Transmission (%)	E_{546}	V. C. (Titer)
1.	A	95	0,050	$3,2 \times 10^6$
	B	60	0,223	$4,0 \times 10^7$
	C	10	0,770	$1,6 \times 10^8$
2.	A	90	0,110	$3,5 \times 10^5$
	B	60	0,435	$3,3 \times 10^6$
	C	12	2,0	$2,3 \times 10^7$

[1]) A = lag-Phase, B = log-Phase, C = Beginn der stationären Phase

Durch Bestimmung der Gesamtzellzahl konnte gezeigt werden, daß diese sich zu den Zeitpunkten A, B und C nur geringfügig von der Lebendkeimzahl unterscheidet.

2.8.2. Isolierung und Fraktionierung der Lipide aus Bacillus subtilis

In einen Fermenter von 200 l Nutzinhalt (Modell b 200, AG für Biologische Verfahrenstechnik, Basel, Schweiz) wurden 200 l Nährlösung nach DAVIS & MINGIOLI (1950) gegeben, 30 Minuten bei 120° C sterilisiert und nach Abkühlen

mit 1 l Inoculum (2.6.1., log-Phase) beimpft. Folgende Inkubationsbedingungen wurden angewandt: Bei 37° C und 1200 rpm (Umwurfsystem) wurden 2000 l Luft pro Stunde in die Kulturflüssigkeit eingeleitet. Die Ernte erfolgte zu Beginn der stationären Phase bei einem Zelltiter von ca. 10^9 (E_{546} = 1,8). Durch Abtrennen der Zellen in einer Schlammzentrifuge (10000 rpm; Typ KDD 605 der Firma Westfalia Separator AG., Oelde/Westf.) wurden 740 g Naßgewicht erhalten. Nach Lyophilisieren (WKf Modell L 2 der Gesellschaft für elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau/Odw.) des Zellmaterials (Gewicht: 172 g) konnte das Gesamtlipid (6,88 g; 80 % der theoretischen Ausbeute) nach einer modifizierten Methode von FOLCH et al. (1957) extrahiert werden (DRAUTZ 1973). Die Fraktionierung des Gesamtlipids erfolgte durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel (BISHOP et al. 1967).

2.8.3. Herstellung von Protoplasten von Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe

Die Herstellung von Protoplasten bei Bacillus subtilis wurde in abgewandelter Form nach den Methoden von WEIBULL (1953) und DREWS (1968) vorgenommen. Einzelheiten sind bei KUNZE (1972) aufgeführt.

Die Herstellung von Protoplasten von Schizosaccharomyces pombe gelang folgendermaßen: Submerskulturen des Organismus (2.6.1.) in chemisch definierter Nährlösung wurden in der log-Phase geerntet, das Zellmaterial mehrmals in 0,8 % iger NaCl-Lösung gewaschen und abzentrifugiert (15 Minuten bei 20° C und 3090 rpm = 14900 g; Zentrifugentyp: Christ II KS). Das Zentrifugat wurde in 7 ml Mc-Ilvaine-Puffer pH 6,5 (RAUEN 1964, zusätzlich 0,8 M KCl zur osmotischen Stabilisierung), resuspendiert. Zu dieser Suspension (Gesamtzellzahl: 10^7/ml) wurden 3 ml eines Enzymgemischs (Ultrakonzentrat, aus Streptomyces rimosus: WAHL 1973[1]) gegeben. Nach mehrstündiger Inkubation dieser

[1]) Das Ultrakonzentrat stellte freundlicherweise Herr J. Wahl zur Verfügung

Suspension bei 27° C unter gelegentlichem Umschwenken konnten 1,5 x 10^6 (15 % der Gesamtzellzahl) Protoplasten ausgezählt werden (vgl. Abb. 1).

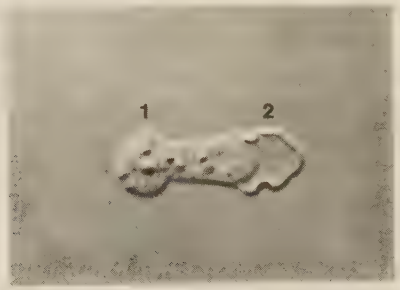

Abb. 1: Schizosaccharomyces pombe Lindner Tü 501.
Mikrophotographie, Interferenzkontrast
1 = "Ausschlüpfender" Protoplast
2 = Optisch leere Zellhülle
Vergrößerung: ca. 2000 x

2.8.4. Messung der Phospholipase A-Aktivität in vitro

Die Bestimmung erfolgte in leicht abgewandelter Form nach WELLS & HANAHAN (1969):

1. Substrat: Synthetisches Lecithin (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin) in Diäthyläther : Methanol = 10 : 1 (v/v).
2. Enzym: Phospholipase A von Crotalus terrificus terrificus (Phosphatidacyl-Hydrolase, EC 3.1.1.4), mit 200 U/mg (25° C, Lecithin als Substrat), erhalten als Lösung in 50 % Glycerin (1 mg/ml). 1 ml Enzymlösung wurde gemischt mit 1 ml einer wässrigen Lösung von NaCl (0,44 M), $CaCl_2$ (40 mM), EDTA (2 mM), und mit 0,1 N KOH auf pH 7,5 eingestellt.
3. Ansatz: 8 ml Substrat (7 mg/ml) wurden mit 0,2 ml

Enzymlösung versetzt (12,5 µg Enzym/ml), 30 Sekunden lang stark geschüttelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3, 6 und 10 Minuten wurden jeweils 2 ml Probe entnommen, mit Äthanol ad 5 ml verdünnt, und die freigesetzte Palmitinsäure mit 0,002 N NaOH in 90 % Äthanol titriert (Mikrobürette der Firma Assistent, Indikator: Kresolrot). Folgende Ansätze wurden gemessen:

a) Kontrolle ohne Enzym
b) Probe
c) Probe mit α-Tocopherol (250 µg/ml)
d) Probe mit Asposterol (25 µg/ml)
e) Probe mit Asposterol und α-Tocopherol.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung des Produzenten

3.1.1. Beschreibung des Stammes

Der Stamm Tü 502 des Lehrbereichs Mikrobiologie I der Universität Tübingen wurde im Mikrobiologischen Großpraktikum 1965/66 aus Erdboden von Neuguinea isoliert. Die Zugehörigkeit zur Gattung Aspergillus war leicht zu erkennen. Die Artbestimmung nach RAPER & FENNELL (1965) führte zu Aspergillus microcysticus Sappa. Maßgebend waren folgende Merkmale (Abb. 2-5):

1. Gut ausgebildete Konidienköpfchen zeigen stets zwei Serien Sterigmata (sie sind "biseriate").
2. Es werden grüne und weiße Konidienköpfchen gebildet (Serie Janus). Sie stehen in der Kolonie auf etwa gleicher Höhe (Unterschied zu Aspergillus janus).[1] Im gleichen Köpfchen wird jeweils nur einer der beiden Konidientypen beobachtet. Auf Malzagar und Czapek-Dox-Agar entwickeln sich morphologisch identische Kolonien, die sich jedoch in den Wachstumsgeschwindigkeiten unterscheiden.
3. Die unscheinbaren Vesikel der grünen und weißen Köpfchen sind im wesentlichen gleich groß.
4. Die Konidien der grünen Köpfchen sind runzelig und größer als die glatten Konidien der weißen Köpfchen, beide Konidienformen sind kugelig.
5. Auf Malzagar werden während 2-3 Wochen Beobachtungszeit keine Überwucherungen gebildet (Unterschied zu Aspergillus ambiguus).

[1]) LOEFFLER 1965

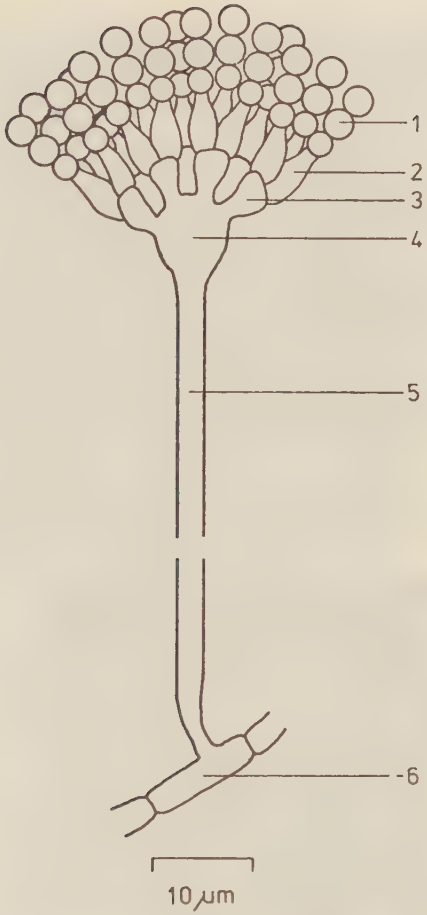

Abb. 2: Aspergillus microcysticus, Konidienfruktifikation. Träger mit farblosen, glatten Konidien

1 = Konidien (conidia), 2 = Phialiden (phialides or secondary sterigmata), 3 = Metulae (metulae or primary sterigmata), 4 = Vesikel, Bläschen (vesicle), 5 = Konidienträger (conidiophore), 6 = Fuß des Trägers ("foot cell")

Abb. 3: Weißes Köpfchen, Kulturbedingungen: Czapek-Dox-Agar, 27° C, 5 Tage, Vergrößerung: ca. 2000 x

Abb. 4: Grünes Köpfchen, Kulturbedingungen: Malzagar, 27° C, 8 Tage, Vergrößerung: ca. 2000 x

Abb. 3-5: Aspergillus microcysticus Sappa Tü 502. Mikrophotographien, Interferenzkontrast, 1-4 siehe Abb. 2.

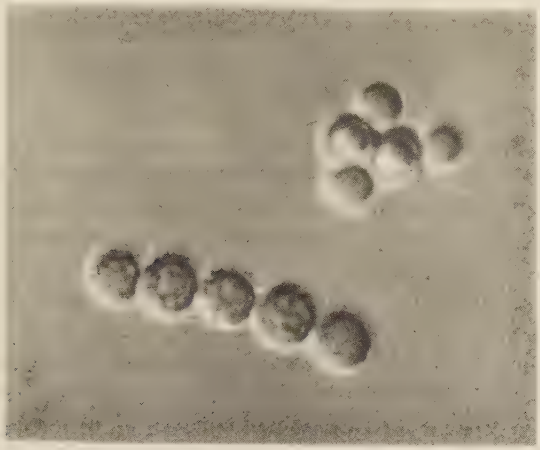

Abb. 5: Weiße (oben) und grüne Konidien, Kulturbedingungen: Malzagar, 27° C, 19 Tage, Vergrößerung: ca. 3000 x

3.1.2. Erhaltung der Aktivität des Stammes

Im Laufe der Zeit änderte sich das ursprüngliche Bild der Pilzkolonie. Der Pilz war regelmäßig auf frisches Medium - Hefeagar-Schrägschicht im Reagenzglas - überimpft, 14 Tage bei 27° C bebrütet, und die Kulturen waren anschließend bei Raumtemperatur aufbewahrt worden. Als Folge von Sektorbildung überwog schließlich die Ausbildung weißer Köpfchen im Luftmyzel. Diese Änderung des Koloniebildes hatte mindestens eine physiologische Konsequenz: Die antibiotische Aktivität sank allmählich bis auf Null. Um periodische Passagen zu umgehen, zumal Sektorabimpfungen keine Auftrennung der Kolonietypen erkennen ließen,

wurde eine Konidiensuspension des Wildtyps lyophilisiert. Für Fermentationen wurde jeweils von solchem Impfmaterial ausgegangen. Das Verfahren lieferte während 18 Monaten jederzeit reproduzierbare Ergebnisse.

3.2. Herstellung des Antibiotikums

3.2.1. Fermentation

Der Einfluß verschiedener Nährlösungen und unterschiedlicher Belüftung auf die Bildung von Asposterol wurde untersucht.

3.2.1.1. Nährlösung

Die Nährlösung nach Raulin-Thom (RAISTRICK & RUDMAN 1956), ein chemisch definiertes ("synthetisches") Medium, hatte sich im Vergleich zu komplexen Medien als besser geeignet erwiesen. Sukzessives Weglassen der einzelnen Medienkomponenten und Variationen im C/N-Verhältnis nach der Graeco-Latin-Square Methode (AUDEN et al. 1967; HASENBÖHLER 1971) ergaben das unter 2.2.2. beschriebene Produktionsmedium. Dabei hatte allein das Weglassen von Ammoniumsulfat eine Steigerung der Asposterol-Konzentration auf mehr als das Doppelte zur Folge, wofür der Mangel an Sulfationen maßgebend ist.

Die Optimalisierungsversuche führten einerseits zu einer Verkürzung der Inkubationszeiten im 10 l-Fermenter von ursprünglich 84 auf 33 Stunden, andererseits zu einer Erhöhung des Asposterol-Gehalts von etwa 5 mg/l auf 50 mg/l.

3.2.1.2. Belüftung

Je besser die Belüftung der Kultur war, desto mehr Asposterol konnte im biologischen Test nachgewiesen werden. Bei Durchlüftungswerten D kleiner als 3 (mMol O_2/h/Liter: COOPER et al. 1944) war überhaupt keine Aktivität mehr festzustellen.

Die Myzelproduktion nahm mit steigenden Durchlüftungswerten ab. Aus diesem Grund wurden für Fermentationen im 200 Liter-Maßstab stets relativ schlecht belüftete, antibiotisch inaktive, aber viel Myzel enthaltende Vorkulturen benutzt, für die Fermentationen zur Herstellung des Antibiotikums selbst jedoch Bedingungen mit starker Belüftung gewählt.

Abbildung 6 zeigt den Fermentationsverlauf im 10 Liter-Maßstab. 200 Liter-Fermentationen verliefen ähnlich, ergaben jedoch wesentlich größere Ausbeuten an Asposterol (bis zu 50 µg/ml Kulturfiltrat).

Wie aus Abbildung 6 (Aktivitätsverlauf) hervorgeht, eignet sich der biologische Test (2.6.2.) nicht zur Bestimmung des Erntezeitpunkts, da 16 Stunden Inkubationsdauer der Testplatten abgewartet werden müssten. Die beginnende Lyse der Kultur fällt jedoch mit dem Aktivitätsmaximum zusammen, und deshalb konnte der Erntezeitpunkt indirekt durch Aufnahme einer Wachstumskurve ermittelt werden.

3.2.2. Anreicherung und Isolierung

Nach beendeter Inkubation (33 Stunden) wurde die Kulturflüssigkeit vom rotbraunen, grießartigen Myzel ("pellets", Geruch wie Lactarius-Arten) durch Filtration getrennt, das Myzel, das nur Spuren an Aktivität enthielt, verworfen, das Filtrat bei pH 7,0 mehrmals mit wenig Äthylacetat (1/10 v/v) extrahiert. Die am Vakuum

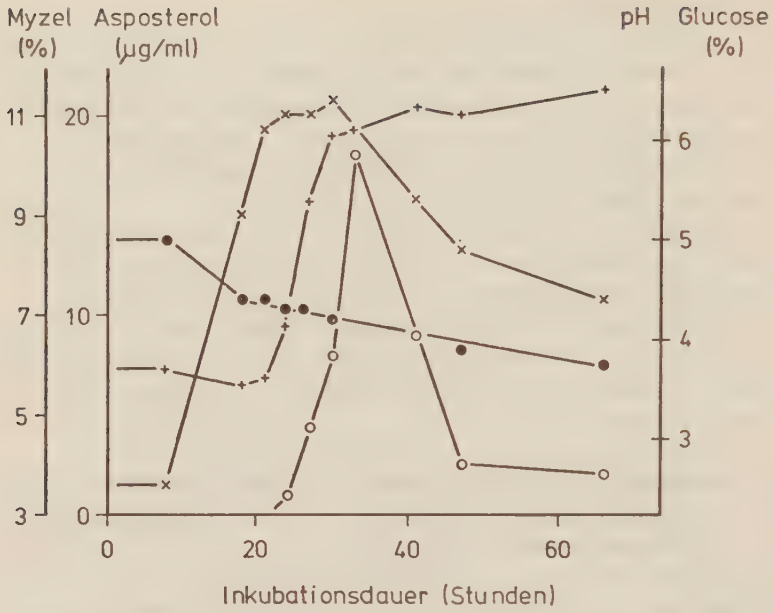

Abb. 6: Fermentation von Aspergillus microcysticus Tü 502 im 10 l-Fermenter (drei Parallelen). Fermentationsbedingungen und -analyse siehe 2.7.1.3. und 2.7.2.
Abszisse : Inkubationsdauer in Stunden
Ordinaten: Konzentration von Asposterol (-o-o-) und Glucose (-●-●-) sowie Wachstums- (-x-x-) und pH-Verlauf (-+-+-)

zur Trockne eingeengten Extrakte ergaben einen braunen, viskosen Rückstand. Dieser Rohextrakt (Tab. 4 A) wurde in zwei Aufarbeitungsschritten gereinigt:

- Fällung überwiegend inaktiver Bestandteile mit Petroläther (15 % Verlust an aktiver Substanz: Tab. 4 B)
- Säulen-Chromatographie an Kieselgel im Dunkeln bei $+4^{\circ}$ C mit praktisch 100 % Ausbeute. Bei Raumtempera-

tur entstanden erhebliche Verluste an aktiver Substanz (bis zu 84 %, vgl. 3.3.1.). Die Säulen-Chromatographie wurde mit zwei verschiedenen Elutionsmitteln durchgeführt:

1. Benzol : Äthylacetat = 95 : 5 (v/v)
2. Benzol : Äthylacetat = 1 : 1 (v/v)

Die Fraktionen sind in Tabelle 3 beschrieben.

Tab. 3: Eluatvolumina und deren Eigenschaften

	Fraktion	ml	Eigenschaften
1. Elutionsmittel	1	230	farblos, inaktiv
	2	430	gelber, inaktiver Farbstoff
	3	200	farblos, inaktiv
2. Elutionsmittel	4	200	farblos, inaktiv: das 2. Elutionsmittel erscheint im Durchlauf (anderer Brechungsindex)
	5-10	100	farblos, aktiv (Tab. 4 C)

Die aktivsten Eluate (meist Fraktionen 6-9, Tab. 3) ergaben, nachdem sie am Vakuum eingeengt und getrocknet worden waren, dünnschicht-, sowie gaschromatographisch einheitliches Asposterol.

Die Zusammensetzung der während einer Aufarbeitung anfallenden Präparate ist aus Tabelle 4 ersichtlich. Die spezifischen Aktivitäten der Präparate A, B und C wurden mit Hilfe von Agardiffusionstests bestimmt (Abb. 7). Abbildung 7 zeigt den Konzentrationsbereich, in dem der Hemmhofdurchmesser dem Logarithmus der Antibiotikumskonzentration proportional ist ("linearer Bereich").

Die untere Nachweisgrenze des Antibiotikums im Agardiffusionstest lag bei 1 µg pro Milliliter Testlösung.

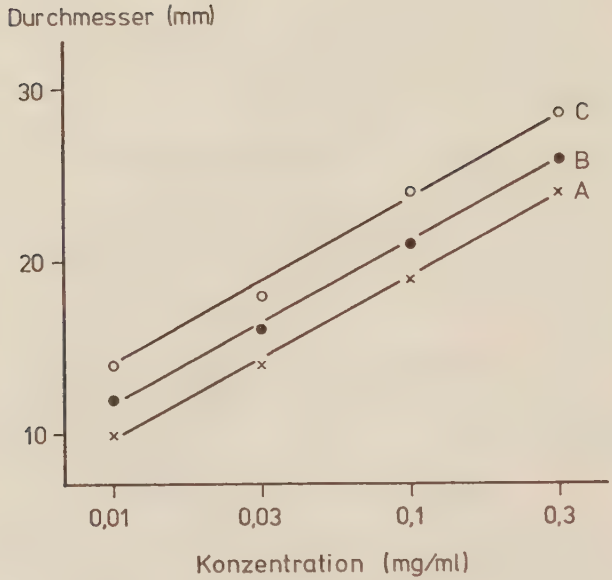

Abb. 7: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von der Konzentration. C = Asposterol; B, A = angereicherte Präparate (Tab. 4). Halblogarithmische Darstellung.
Testorganismus: Bacillus subtilis. Einsaat: 10^5 Sporen/ml Keimschicht. Testmedium: Tartratagar. Inkubation: 16 Stunden bei 37^0 C

Hemmhöfe von 35 mm Durchmesser wurden auch durch höchste Asposterol-Konzentrationen (10 mg/ml und mehr) nicht überschritten.

Tab. 4: Quantitative Auswertung einer Aufarbeitung im 200 l-Maßstab

Aufarbeitungsschritt[1)]	Gesamtgewicht (g)	Spezifische Aktivität	Gesamtaktivität	Anreicherung	Ausbeute (%)
A	7,940	37,5	298	1	100
B	4,227	60	253	1,6	85
C	2,300	100	230	2,6	77

[1]) A = Rohextrakt
B = eingeengter Überstand der Petrolätherbehandlung
C = aktivste Fraktionen der Säulen-Chromatographie (Asposterol, Tab. 3: Fraktionen 6-9)

3.3. Physikalische und chemische Eigenschaften des Antibiotikums

3.3.1. Löslichkeit und Stabilität

Asposterol ist ein farbloses Pulver mit stark lipophilen Eigenschaften. Es ist schwerlöslich in Wasser (bis 0,030 mg/ml), gut löslich dagegen in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme des Petroläthers. Das Antibiotikum ist, wie auch viele andere Lipide (JOHNSON & DAVENPORT 1971), nur unter besonderen Bedingungen stabil. Wurde es im evakuierten Exsikkator über Kieselgel lichtgeschützt bei -22° C aufbewahrt, so war auch nach Monaten kein Aktivitätsverlust zu beobachten. Stammlösungen des Antibiotikums (1 mg/ml Äthanol) erwiesen sich bei -22° C einige Wochen lang als stabil, bei Raumtemperatur verloren sie jedoch innerhalb von 20 Stunden 50 % ihrer biologischen Aktivität. Wurden trockene, substanzbeladene Filterpapierrondellen 20 Stunden lang bei 37° C inkubiert, so war ein Aktivitätsverlust von 87 % zu verzeichnen (Agardiffusionstest; Konzentration der geprüften Lösung: 26 µg Asposterol/ml Äthanol). Nach Autokla-

vieren der genannten Rondellen (20 Minuten bei 120° C) war ein nahezu vollständiger Aktivitätsverlust erreicht.

3.3.2. Dünnschicht-Chromatographie (DC) und Identifizierung

Die Chromatographie von Asposterol ergab die in Tabelle 5 zusammengestellten R_f-Werte.

Tab. 5: R_f-Werte von Asposterol in verschiedenen Laufmittelsystemen

DC-Alufolien mit Kieselgel F 254 Laufmittel (v/v)	R_f-Wert
1. Benzol : Methanol : Eisessig = 45 : 8 : 4	0,42
2. Äthylacetat	0,57
3. Benzol : Methanol : Eisessig = 4 : 1 : 1	0,66
4. Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 1	0,79
5. Aceton : Methanol : Wasser = 4 : 5 : 1	0,84

Auf entwickelten DC-Folien ist Asposterol nachweisbar:

a) im Bioautogramm (ZÄHNER & MAAS 1972),
b) durch Löschung der Fluoreszenz (s. Tab. 5, Betrachtung im UV-Licht),
c) nach Erhitzen (130° C, 20 Min.) als hellbraun-violettroter Fleck,
d) durch Anfärbung mit verschiedenen, mehr oder weniger spezifischen Sprühreagenzien (Tab. 6).

Die in Tabelle 6 zusammengestellten Farbreaktionen eignen sich teils zum Anfärben des Asposterols, teils zu dessen Unterscheidung von α-Tocopherol (vgl. 3.4.4.).

Tab. 6: Sprühreagenzien zum Anfärben von Asposterol und zur Unterscheidung von α-Tocopherol [1)]

Nummer (STAHL 1967)	Sprühreagenz	Geeignet für folgende Verbindungsklassen	Asposterol	α-Tocopherol
88-90	Dragendorffs Reagenzien	Alkaloide und andere N-haltige Verbindungen	+	0
130	Jod-Schwefelsäure	organische N-Verbindungen, Polyäthylenglykole u. -derivate	+	0
158	Molybdatophosphorsäure	reduzierende Verbindungen, Lipide, Sterine, Steroide	+	+
84	α, α'-Dipyridyl-Eisen-(III)-chlorid	Phenole, Vitamin E und andere reduzierende Verbindungen	0	+
153	Leukomethylenblau	Ubi-, Plasto-, Tocopherylchinone	0	+

[1)] + = positive Reaktion
0 = negative Reaktion

3.3.3. Spektren

Das UV-Absorptionsspektrum des Antibiotikums zeigt kein Maximum (Zeiss Spektralphotometer RPQ 20 A V; 0,2 mg Asposterol/ml, in Äthanol; Endabsorption ab 250 nm). Damit ist eine Verbindung mit mehreren konjugierten Doppelbindungen auszuschließen. Wird das Spektrum in alkalischer (0,1 N NaOH), äthanolischer Lösung aufgenommen, so ist ein Maximum bei 285 nm ($\varepsilon = 5{,}8 \times 10^3$) zu beobachten. Die ursprünglich farblose Lösung wird dabei gelb und zeigt im Agardiffusionstest keine biologische Aktivität mehr. Saure Lösungen des Antibiotikums (80 % Ameisensäure, 8 Stunden bei 100° C) ergeben jedoch keine völlige Zerstörung

des Moleküls (Massenspektrum, Dünnschicht-Chromatographie).

Die Versuche zur Strukturaufklärung des Antibiotikums werden am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt und sind noch nicht abgeschlossen, doch wurden die bis jetzt vorliegenden Spektren und übrigen Daten zur Verfügung gestellt. Den Herren Privatdozent Dr. W. König und Dr. H. Kneifel danke ich auch an dieser Stelle herzlich.

Auf Grund eines hochaufgelösten Massenspektrums (Tab. 7) wurde die Summenformel $C_{24}H_{33}NO_4$ (MG: 399) ermittelt.

Tab. 7: Genaue Massenbestimmung von Asposterol mit Hilfe der Hochauflösungs-Massenspektrometrie

Gemessen	Berechnet	Summenformel	Abweichung[1)]	Interpretation
399,2421	399,2409	$C_{24}H_{33}NO_4$	1,2	M^+
371,2439	371,2460	$C_{23}H_{33}NO_3$	2,1	M-CO
356,2228	356,2226	$C_{22}H_{30}NO_3$	0,2	M-(CO+CH_3)
222,1119	222,1130	$C_{12}H_{16}NO_3$	1,1	M-$C_{12}H_{17}O$

[1)] Abweichung in Millimassen

Gerät: AEI, MS 9 Massenspektrometer, 70 eV Peak-Matching-Verfahren bei Auflösung 10.000

Aus Dünnschicht-Chromatogrammen sowie dem Gaschromatogramm (Abb. 8) geht hervor, daß die Asposterol-Präparate nicht nachweisbar verunreinigt sind. Peak 1 und 2 in Abbildung 8 stellen Isomere mit identischen Massenspektren dar.

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen einerseits das Massenspektrum von natürlichem Asposterol, andererseits das Massenspektrum des Trifluoracetylderivats (Peak 1 in Abb. 8).

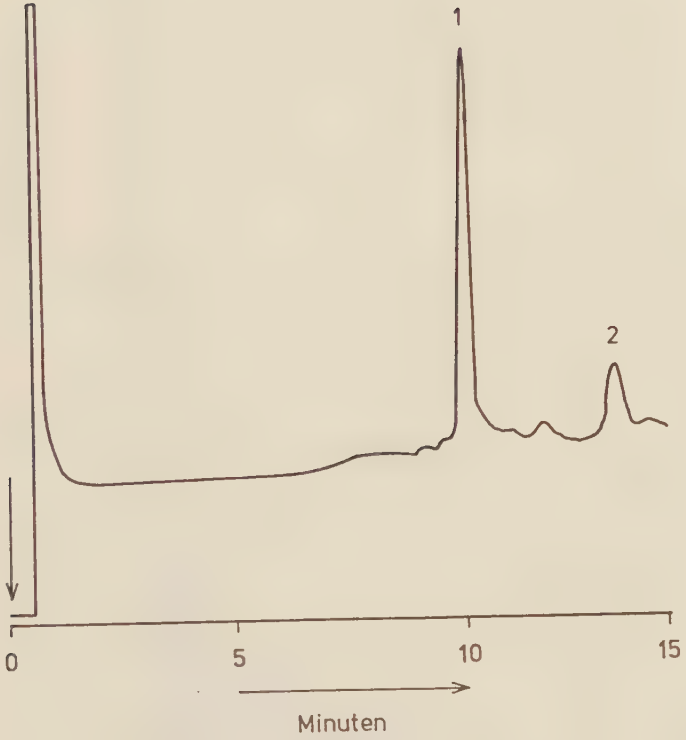

Abb. 8: Gas-Chromatogramm des Trifluoracetylderivats von Asposterol
Gerät: LKB 9000 GC-MS, Säule: 3 m 3 % O V 17, Glassäule, 200° C Anfangstemperatur; Temperaturprogramm: 4° C/Minute

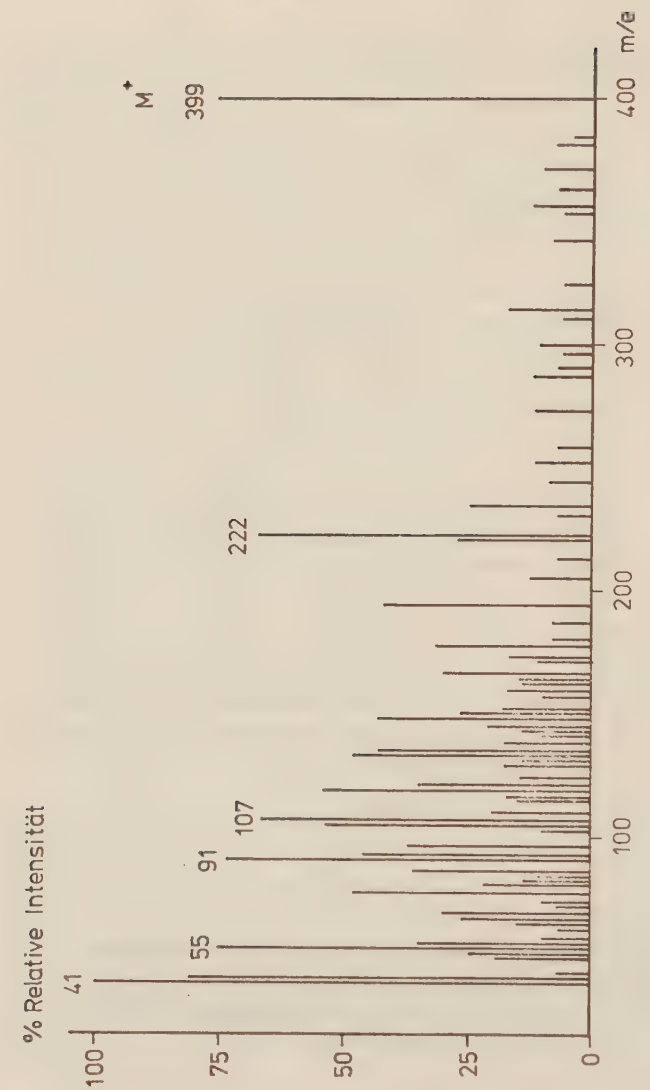

Abb. 9: Massenspektrum von Asposterol
Gerät: siehe Abb. 10

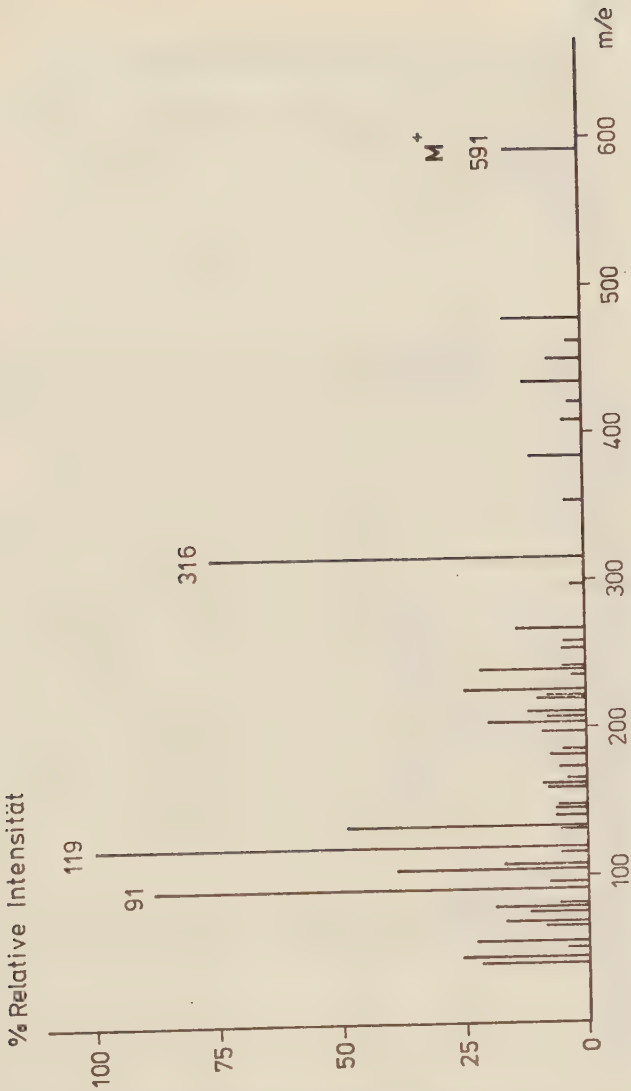

Abb. 10: Massenspektrum von Asposterol, TFA-Derivat, Peak 1 (vgl. Abb. 8)
Gerät: LKB 9000, Gas-Chromatograph-Massenspektrometer; 70 eV; 3,5 kV Beschleunigungs-Spannung

3.3.4. Partialstruktur und funktionelle Gruppen

Aus der Summenformel $C_{24}H_{33}NO_4$ ergibt sich die Summe (S) der Ringe und Doppelbindungen nach der Formel (WILLIAMS & FLEMING 1968):

$$S = \frac{(2a + 2) - (b - d)}{2}$$

$$S = 9$$

a = 24
b = 33
d = 1

Möglich sind also beispielsweise fünf Ringe und vier Doppelbindungen. Die katalytische Hydrierung von Asposterol mit Pd/H_2 ergibt ein Molekül mit dem Molekulargewicht 403 (Aufnahme von vier H gegenüber MG: 399). Die Reduktion dieses Produkts mit $LiAlH_4$ führt zu einem Molekül mit dem Molekulargewicht 407. Daß hierbei zwei Ketogruppen in die entsprechenden Hydroxylfunktionen übergehen, lässt sich einerseits mit der Bildung eines Di-O-Methyloxims, andererseits durch die Deutung des ^{13}C-NMR-Spektrums belegen. Nach Reduktion der beiden Ketogruppen lassen sich zusätzlich zu den ursprünglich vorhandenen beiden trifluoracetylierbaren OH-Gruppen zwei weitere Hydroxylfunktionen nachweisen (Abb. 10). In Abbildung 11 ist das ^{13}C-Fourier-Transform-NMR-Spektrum von Asposterol dargestellt. Die Tabelle 8 zeigt die dazugehörigen chemischen Verschiebungswerte einschließlich deren Deutung.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse wurde von Herrn Dr. W. König ein Steranskelett für das Antibiotikum postuliert.

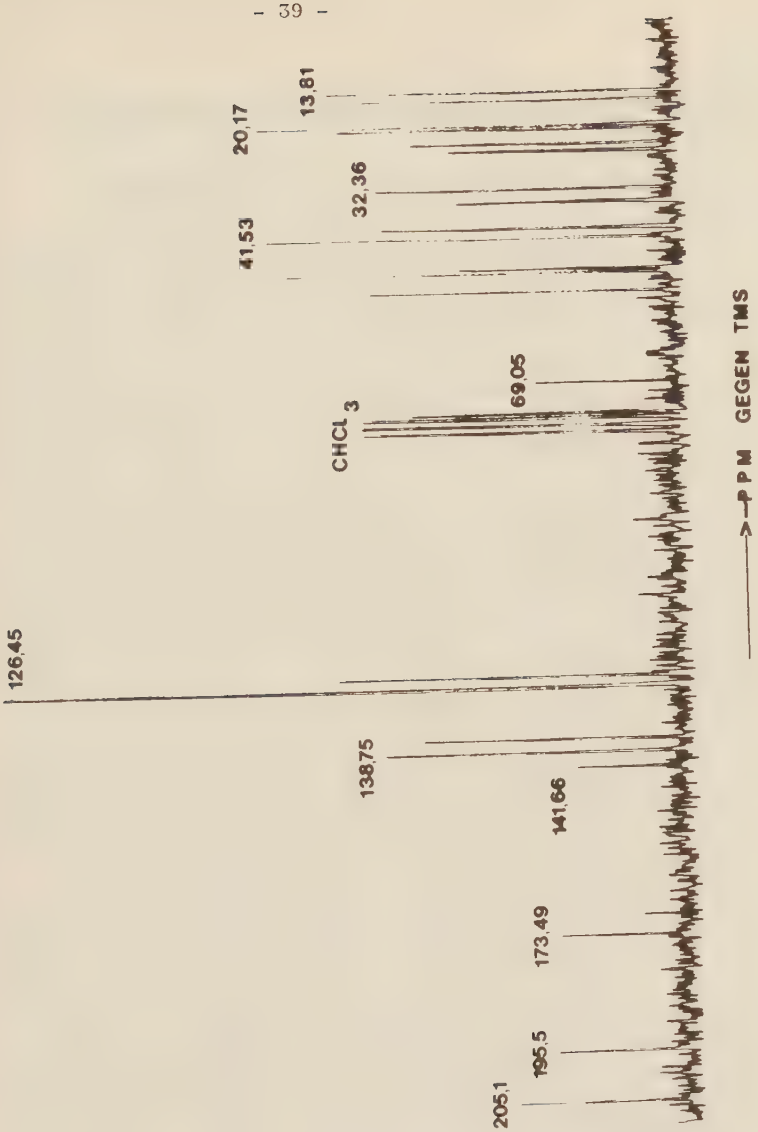

Abb. 11: ^{13}C-Fourier-Transform NMR-Spektrum von Asposterol
Gerät: Bruker HX 90

Tab. 8: Chemische Verschiebungswerte bei Asposterol (vgl. Abb. 11)

Verschiebungswert (-ppm gegen TMS)	Deutung
13,81	CH_3
15,42	CH_3
20,17	CH_3
20,93	CH
23,73	CH_3
25,13	CH_2
32,36	CH_2
34,84	CH
39,70	CH_2
41,53	CH
47,36	CH
48,22	CH_2
51,78	CH
69,05	C-OH
74,66	CH-OH
124,61	=CH
126,45	=CH (2 x)
136,26	=C
138,75	=C
141,66	=C
173,49	N-C=
195,50	C=O
205,10	C=O

3.4. Biologische Eigenschaften des Antibiotikums

3.4.1. Wirkungsspektrum

Die Wirkung von Asposterol auf verschiedene Mikroorganismen wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests geprüft. Die vollständigen Artnamen der Teststämme, deren Herkunft und weitere Einzelheiten sind im Methodenteil aufgeführt (2.4., 2.6.).

Sämtliche Testorganismen, mit Ausnahme von Escherichia coli, wurden durch das Antibiotikum gehemmt, wobei 0,5 mg/ml oder schwächere Asposterol-Konzentrationen wirksam waren.

Bei allen mit Myzel wachsenden Pilzen wurde bereits die Ausbildung von Substrathyphen gehemmt. Mikroskopische Kontrollen des Hemmzonenrandes ließen in keinem Falle morphologische Veränderungen der Hyphen erkennen (HÜTTER et al. 1965; BARATHOVA et al. 1969; MAHL 1971; PFEFFERLE 1972).

Das Wachstum von Escherichia coli wurde selbst durch 1 mg/ml Antibiotikum nicht beeinflußt. Während sich der Wildtyp als unempfindlich erwies, war ein Polymyxin-resistenter Stamm - Escherichia coli K 12 W 945 Po 8 H (BECK 1973) - empfindlich gegen Asposterol (vgl. 4.).

Das Wirkungsspektrum ist demnach sehr breit. Es müssen jedoch noch einige gramnegative Keime auf ihre Empfindlichkeit geprüft werden, um aussagen zu können, ob das Kontinuum des Spektrums nicht doch an einer Stelle unterbrochen ist.

Da minimale Hemmkonzentrationen von verschiedenen Parametern abhängig sind (ZÄHNER & MAAS 1972), wurden diese in Submerskulturen unter standardisierten Bedingungen ermittelt. Als Vertreter der Prokaryonten wurde Bacillus subtilis (vgl. Abb. 7), für die Eukaryonten Schizosaccharomyces pombe gewählt (3.4.2.2.).

3.4.2. Minimale Hemmkonzentrationen

3.4.2.1. Bacillus subtilis

3.4.2.1.1. Chemisch definiertes Medium

Abbildung 12 zeigt den Verlauf von Wachstumskurven in chemisch definiertem Medium. Asposterol wurde in verschiedenen Konzentrationen (2-6) und zu verschiedenen Zeiten (A, B und C) zugesetzt (vgl. Tab. 2).

Das Antibiotikum wirkt sofort nach Zugabe in allen Wachstumsphasen. Ein weiterer Versuch mit Sporen von Bacillus subtilis (10^5 Sporen/ml) ergab, daß bereits deren Auskeimung gehemmt wird (bei A: 0,14 µg Asposterol/ml). Um eine erkennbare Wirkung hervorzurufen (Lyse, s. u.), muß bei Zugabe in der stationären Phase (Abb. 12 C) die Konzentration des Antibiotikums um den Faktor 10 erhöht werden. Solche Beobachtungen mit anderen Antibiotika lassen sich teilweise durch die mit der Entwicklungsphase der Bakterienkultur veränderten Bedingungen erklären, beim Asposterol scheint jedoch allein die vergrößerte Zahl vorhandener Zellen (Populationsdichte) zur Erklärung zu genügen: Unter der Voraussetzung, daß Asposterol in wässriger Lösung monomer vorliegt, treffen bei B und C ungefähr gleich viele Antibiotikums-Moleküle (ca. 10^7) auf einen einzelnen Keim von Bacillus subtilis.

Die minimale Hemmkonzentration in der log-Phase (Keim-Titer: 4×10^7) beträgt 0,3 µg ($7{,}52 \times 10^{-4}$ mMol) Antibiotikum pro Milliliter Kulturflüssigkeit (Kurve 4). Inkubiert man die Kulturen nach Asposterol-Zugabe einige Stunden lang weiter, so beginnen die Zellen wieder zu wachsen (Kurve 4), was allerdings nur bei minimaler Hemmkonzentration gilt. Eine Selektion resistenter Keime ist auszuschließen, da die überlebenden Zellpopulationen die gleiche Empfindlichkeit gegen das Antibiotikum wie unbe-

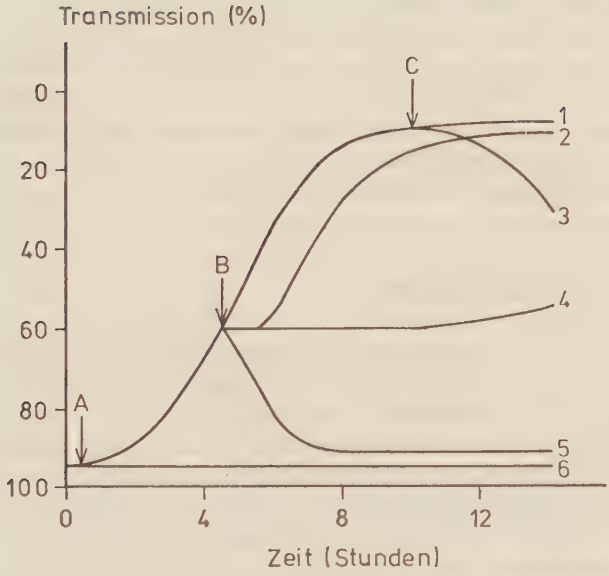

Abb. 12: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Asposterol für Bacillus subtilis in chemisch definiertem Medium.
Die Wachstumskurven mehrerer Versuche im Biophotometer wurden umgezeichnet.
Zusatz des Antibiotikums zur Zeit A, B und C (vgl. 2.8.1.)
Inkubationstemperatur: 37° C

1: Kontrolle ohne Antibiotikum
2: 0,14 µg Asposterol/ml (B)
3: 3,0 " (C)
4: 0,3 " (B)
5: 1,4 " (B)
6: 0,14 " (A)

handelte Zellen zeigen.

Asposterol führt bereits in Konzentrationen, die nur geringfügig höher als die minimale Hemmkonzentration sind, unmittelbar nach Zugabe des Antibiotikums zum Absinken der Kurven, was auf eine Lyse der Zellen schließen läßt (Bakterizidie). In den Biophotometerkulturen ließen sich dann keine lebensfähigen Keime mehr nachweisen, weder durch Mikroskopieren des Zentrifugats, noch durch Ausplattieren des gewaschenen Sediments.

3.4.2.1.2. Komplexmedium

Die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Asposterol für Bacillus subtilis in komplexer Nährlösung (2.2.4.) ist in Abbildung 13 dargestellt.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen, daß die Empfindlichkeit von Bacillus subtilis in komplexer und chemisch definierter Nährlösung verschieden groß ist. Die minimale Hemmkonzentration (log-Phase) beträgt im Komplexmedium 2,1 µg Asposterol pro Milliliter und ist bei gleicher Keimzahl um den Faktor 7 größer als im chemisch definierten Medium (Abb. 12 und 13, Kurven 4 und 3). Diese Differenz beruht vermutlich nicht nur auf der kürzeren Generationszeit von Bacillus subtilis in komplexem Medium, sondern auch auf der Anwesenheit von Antagonisten (vgl. dazu 3.4.3.).

3.4.2.2. Schizosaccharomyces pombe

Die Spalthefe Schizosaccharomyces pombe Lindner - Klasse Ascomycetes, Unterklasse Endomycetidae - Stamm Tü 501, bot sich durch ihre starke Empfindlichkeit gegen Asposterol im Agardiffusionstest, durch ihren Teilungsmodus (Spalttypus: MÜLLER & LOEFFLER 1971), sowie wegen ihrer ausschließlich vegetativen Vermehrung für Versuche im Biophotometer an.

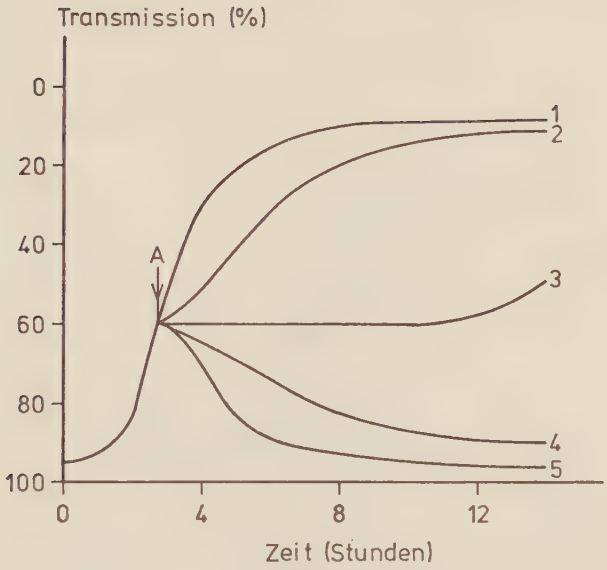

Abb. 13: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Asposterol für Bacillus subtilis in komplexer Nährlösung.
Zusatz des Antibiotikums zur Zeit A (vgl. 2.8.1.)
Inkubationstemperatur: 37° C

1: Kontrolle ohne Antibiotikum
2: 1,4 µg Asposterol/ml (A)
3: 2,1 "
4: 3,0 "
5: 7,0 "

3.4.2.2.1. Chemisch definiertes Medium

Abbildung 14 zeigt den Verlauf von Wachstumskurven in chemisch definiertem Medium (MITCHISON 1970). Asposterol wurde in verschiedenen Konzentrationen (2-6) und zu verschiedenen Zeiten (A, B und C) zugesetzt. In Tabelle 2 ist die Korrelation zwischen Transmission, Extinktion und Lebendkeimzahl (V. C.) der Kultur angegeben.

Auch Schizosaccharomyces pombe wird durch Asposterol in allen Wachstumsphasen gehemmt. Im Gegensatz zu Bacillus subtilis (Abb. 12 und 13) werden die Zellen der Spalthefe selbst bei hohen Konzentrationen des Antibiotikums (Kurve 5) nicht lysiert. Die minimale Hemmkonzentration in der log-Phase (Keim-Titer: $3{,}3 \times 10^{6}$) beträgt 1,2 µg (3×10^{-3} mMol) Asposterol pro Milliliter Kulturflüssigkeit (Kurve 4). Außerdem ist aus Abbildung 14 ersichtlich, daß im Vergleich zu Bacillus subtilis die Hemmwirkung nicht unmittelbar nach Zugabe des Antibiotikums erfolgt, sondern erst nach ungefähr 60 Minuten (Kurve 4). Hohe Asposterol-Konzentrationen (z. B. das 17-Fache der minimalen Hemmkonzentration) führen ohne Verzögerung zur Hemmung (Kurve 5). Außerdem konnte durch Bestimmung der Lebendkeimzahl gezeigt werden, daß das Antibiotikum dann fungizid wirkt.

3.4.2.2.2. Komplexmedium

Wurde Schizosaccharomyces pombe in komplexer Nährlösung (2.2.4.) angezogen, so ist bei gleichem Zelltiter im Vergleich zur chemisch definierten Nährlösung die minimale Hemmkonzentration nur geringfügig größer (2,8 µg Asposterol/ml). Aus diesem Grund wurden die Versuche des folgenden Kapitels mit Bacillus subtilis durchgeführt.

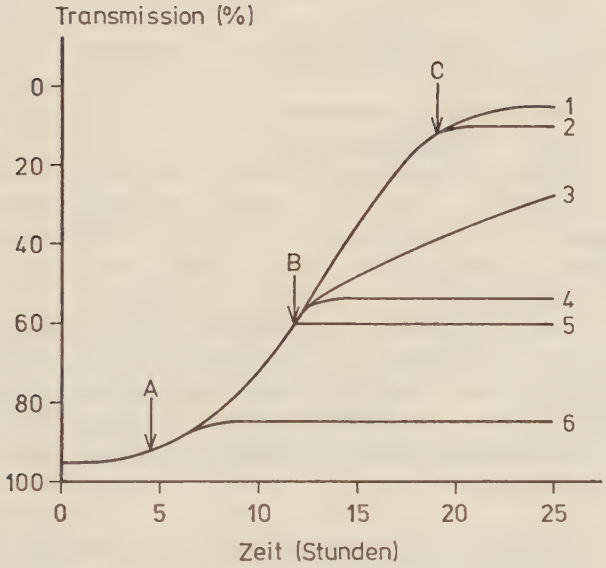

Abb. 14: Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration von Asposterol für Schizosaccharomyces pombe in chemisch definiertem Medium.
Die Wachstumskurven mehrerer Versuche im Biophotometer wurden umgezeichnet.
Zusatz des Antibiotikums zur Zeit A, B und C (vgl. 2.8.1.)
Inkubationstemperatur: 27° C

1: Kontrolle ohne Antibiotikum
2: 5,7 µg Asposterol/ml (C)
3: 0,7 " (B)
4: 1,2 " (B)
5: 21 " (B)
6: 0,7 " (A)

3.4.3. Antagonisten des Asposterols

3.4.3.1. Diffundierende (vorwiegend hydrophile) Präparate

In Tabelle 9 sind die im Kreuztest geprüften Stoffe zusammengestellt. Asposterol wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml (Äthanol) angewendet.

Aus Tabelle 9 geht hervor, daß die Wirkung von Asposterol durch Hefeextrakt und gewöhnliches Eigelb am stärksten aufgehoben wird. Beide Male ergab sich das Bild einer "kompetitiven Antagonisierung" (PACHE & ZÄHNER 1969). Verschiedene andere lipophile Antibiotika verhalten sich analog (Tab. 11).

Durch Extraktion wässriger Lösungen von Eigelb und Hefeextrakt mit Petroläther (Siedebereich 40-60° C) konnte gezeigt werden, daß lipophile Komponenten für die antagonisierende Wirkung verantwortlich sind. Im nächsten Abschnitt werden deshalb die enthemmenden Wirkungen von Lipiden beschrieben.

3.4.3.2. Schlecht diffundierende (vorwiegend lipophile) Präparate

3.4.3.2.1. Definierte Lipide

Der Streifengradiententest erlaubt - im Gegensatz zum Kreuztest - die Suche nach potentiellen Antagonisten mit extrem schlechten Diffusionseigenschaften. Die Interpretation positiver Ergebnisse ist jedoch problematisch, da sich ein exponentieller Konzentrationsgradient (Antibiotikum) einem linearen (Antagonist) überlagert (ZÄHNER & MAAS 1972). Als reproduzierbare Angabe erweist sich die Abnahme der Hemmzonenbreite entlang dem Filterpapierstreifen. Die entsprechende scheinbare Verminderung der Asposterol-Konzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 7) ermittelt und in Prozentangaben ausgedrückt.

Tab. 9: Aufhebung der durch Asposterol verursachten Hemmwirkung durch verschiedene Präparate im Kreuztest

Präparat	Konzentration der Lösung (mg/ml)	Aufhebung[1]
Komplexe Gemische:		
Hefeextrakt	100	+++
Eigelb	unverdünnt	+++
Pepton aus Casein	100	++
Fleischextrakt	100	++
Malzextrakt	100	+
Casamino acids	100	0
Definierte Verbindungen:		
Alle biogenen Aminosäuren, einzeln	1 und 10	0[2]
Acht wasserlösliche Vitamine, einzeln	1 und 10	0[3]
Ölsäure	1	0
Linolsäure	1	0
Linolensäure	1	0
Arachidonsäure	1	0
Tween 80	unverdünnt	++

[1]) Testorganismus: Bacillus subtilis, weitere Bedingungen s. Abb. 7.
Aufhebung +++ = stark; ++ = mittelmäßig; + = schwach; 0 = keine Aufhebung.

[2]) Folgende Aminosäuren waren in der Konzentration von 10 mg/ml toxisch: Cystein, Leucin und Serin.

[3]) Folgende Vitamine wurden getestet: Ascorbinsäure, Biotin, Cobalamin, Nicotinsäure, Pantothensäure, Pyridoxin, Riboflavin und Thiamin.

Die im Streifengradiententest geprüften Lipide wurden nach JOHNSON & DAVENPORT (1971) klassifiziert und sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Aufhebung der durch Asposterol verursachten Hemmwirkung durch verschiedene Lipide im Streifengradiententest

Lipid	Aufhebung[1)]	Bemerkungen
NEUTRALE LIPIDE		
Fettsäuren		
Palmitinsäure	0	
Stearinsäure	0	
Undecen-(10)-säure	0	toxisch ab 50 µg/ml[2)]
Ölsäure	0	toxisch ab 500 µg/ml
Linolsäure	0	toxisch ab 50 µg/ml[2)]
Linolensäure	0	toxisch ab 15 µg/ml[2)]
Arachidonsäure	0	toxisch ab 25 µg/ml[2)]
Carotinoide		
ß-Carotin	0	toxisch ab 300 µg/ml
Terpene		
Vitamin A-Acetat	0	
Vitamin A-Alkohol	0	
Steroide		
Ergosterin	0	
Stigmasterin	0	
Cholesterin	0	
Cholsäure	0	toxisch ab 800 µg/ml
Desoxycholsäure	0	toxisch ab 50 µg/ml[2)]
Taurocholsäure	0	toxisch ab 800 µg/ml
Östradiol	0	
Östriol	0	
Östron	0	
Vitamin D_3	0	toxisch ab 600 µg/ml

(Tab. 10, Fortsetzung)

Lipid	Aufhebung[1]	Bemerkungen
AMPHIPHILE LIPIDE		
Phosphoglyceride		
Lecithin aus Eigelb	++	Aufhebung 50 %[3]
Lecithin (synthetisch)	+	Aufhebung 38 %[3]
Cardiolipin	0	toxisch ab 160 µg/ml
REDOXLIPIDE		
Chinone		
Vitamin K_1	0	
Chromane		
α-Tocopherol	+++	Aufhebung 87 %[3]
α-Tocopherol-Acetat	+	Aufhebung 36 %[3]
α-Tocopherylphosphat x Na_2	++	Aufhebung 60 %[3]

[1]) Testorganismus: Bacillus subtilis.
Aufhebung +++ = stark; ++ = mittelmäßig; + = schwach; 0 = keine Aufhebung.

[2]) Die Unterschicht enthielt nur 0,1 mg Lipid/ml.

[3]) Aufhebung = (errechnete) scheinbare Verminderung der Asposterol-Konzentration.

Das aus dem Filterpapierstreifen, der mit Asposterol-Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml getränkt war, diffundierende Antibiotikum wirkt nur noch zu 50 %, wenn in der Unterschicht der Testplatte 333 µg α-Tocopherol pro Milliliter enthalten sind. Diese spezifische Beeinflussung des Antibiotikums wurde im Biophotometer-Versuch auch für Schizosaccharomyces pombe beobachtet (3.4.4.2.).

Eine gut aufhebende Wirkung im Streifengradiententest zeigen nur wenige Lipide, wie aus Tabelle 10 hervorgeht. Am besten wirkt α-Tocopherol. Lecithin ist ein schwacher Antagonist des Asposterols. Bestimmte Steroide, welche die Wirkung von Lipomycinen (KUNZE et al. 1972) und an-

deren Polyen-Antibiotika (KINSKY 1967) aufheben, sind gegenüber Asposterol wirkungslos. Dasselbe gilt für Cardiolipin, das außer den Lipomycinen auch die "Substanz Tü 96" (HÜTTLIN 1972) antagonisiert. In diesem Zusammenhang sind in Tabelle 11 die Aufhebungsmuster für verschiedene membranophile Antibiotika zusammengestellt.

Tab. 11: Aufhebungsmuster für verschiedene membranophile Antibiotika mit bestimmten Lipiden

Lipide	Antibiotika[1] Bor.[2]	Chl.[2)3)]	Lip.[2)4)5)]	96[2)4)]	Asp.[2)4)5)]
Eigelb[6]	++	++	++	++	++
Lecithin	++	++	++	+	+
Cardiolipin	-	++	++	++	0
Fettsäuren	++	-	+	0	0
Steroide	+	-	++	0	0
α-Tocopherol	-	-	+	+	++
Vitamin K_1	-	-	++	0	0

Testorganismus: Bacillus subtilis auf (in) chemisch definiertem Medium, weitere Bedingungen s. u.

Aufhebung ++ = stark; + = schwach; 0 = keine Aufhebung; - = keine Angabe.

[1]) Antibiotika:
Boromycin (PACHE 1969)
Chlorothricin (PACHE & CHAPMAN 1972; SCHINDLER 1973)
Lipomycine(KUNZE 1972; KUNZE et al. 1972)
Substanz Tü 96 (HÜTTLIN 1972)
Asposterol

[2]) Kreuztest

[3]) Spin label Experiment

[4]) Streifengradiententest

[5]) Biophotometer-Versuch

[6]) Weitere Antibiotika, welche durch Lipoprotein aus Eigelb antagonisiert werden, sind bei PACHE & ZÄHNER (1969) aufgeführt.

3.4.3.2.2. Lipide aus Bacillus subtilis

Können aus Lipidextrakten sensitiver Organismen Substanzen mit antagonisierenden Wirkungen isoliert werden, so stellen diese möglicherweise Bindungsstellen für das Antibiotikum dar (HALDER & BOSE 1971). Um festzustellen, ob das Gesamtlipid von Bacillus subtilis weitere Antagonisten des Asposterols enthält, wurden Lipidfraktionen (BISHOP et al. 1967) im Streifengradiententest geprüft (Tab. 12). Referenz-Antibiotika waren die Lipomycine (KUNZE 1972) sowie "Substanz Tü 96" (HÜTTLIN 1972).

Tab. 12: Beeinflussung der durch Asposterol verursachten Hemmwirkung durch einzelne Fraktionen des Gesamtlipids aus Bacillus subtilis

Präparat[2)]	Antibiotika[1)] Lip.	96	Asp.
Gesamtlipid	++	++	0
Neutrallipide	+	0	0
Glykolipide	++	+	0
Phospholipide	++	+	0
Lipoaminosäuren	0	++	0

Testorganismus: Bacillus subtilis auf chemisch definiertem Medium (Streifengradiententest, s. Tab. 10).

Aufhebung ++ = stark; + = schwach; 0 = keine Aufhebung.

1) Antibiotika:
Lipomycine: 0,2 mg/ml (KUNZE 1972)
Substanz Tü 96: 1 mg/ml (DRAUTZ 1973)
Asposterol: 0,1 mg/ml

2) Die Konzentration der Präparate betrug jeweils 0,5 mg Lipid/ml Unterschicht.

Aus Tabelle 12 geht hervor, daß die Wirkung von Asposterol durch einzelne Lipidfraktionen aus Bacillus subtilis nicht beeinflußt wird.

Tocopherole sind in Lipidfraktionen nur in sehr kleinen Mengen enthalten (LAIDMAN & HALL 1971), sie sind nur bei Anwendung besonderer Kautelen nachweisbar (GAUNT & STOWE 1967) und wären bei der hier angewendeten Aufarbeitung zerstört worden. Nach BISHOP et al. (1967) besteht das Gesamtlipid von Bacillus subtilis aus etwa 75 % Phospholipiden, etwa 10 % Neutrallipiden und einem kleinen Anteil Glykolipiden; Tocopherole (Redoxlipide) sind in diesem Zusammenhang nicht erwähnt.

3.4.4. Charakterisierung antagonistischer Wirkungen im Biophotometer-Versuch

In den Abbildungen 15 und 16 wurde die partielle Aufhebung der Hemmwirkung von Asposterol durch α-Tocopherol bei Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe dargestellt.

Die Abbildungen zeigen, daß α-Tocopherol auch in Submerskulturen die Wirkung des Antibiotikums bei je einem empfindlichen Vertreter der Pro- und Eukaryonten teilweise aufhebt. Um eine Wechselwirkung von Asposterol mit α-Tocopherol in vitro auszuschließen, wurde in weiteren Versuchen zuerst das Antibiotikum zugegeben, nach 60 Minuten der Antagonist. Der Verlauf der Kurven blieb derselbe.

Das molare Verhältnis zwischen Asposterol (MG: 399) und α-Tocopherol (MG: 430), das zu einer deutlichen Aufhebung der Antibiotikums-Wirkung führt, ist jedoch bei Bacillus subtilis (1 : 47) um den Faktor 10 größer als bei Schizosaccharomyces pombe (1 : 4,6).

3.4.4.1. Bacillus subtilis

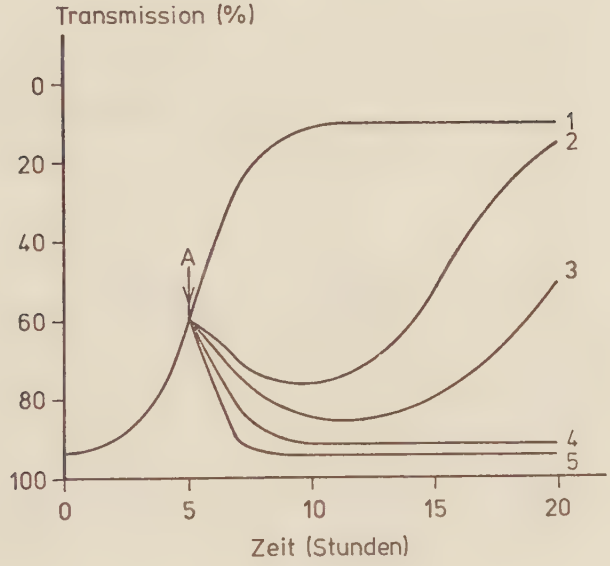

Abb. 15: Partielle Aufhebung der Hemmwirkung von Asposterol (bakterizide Konzentration) durch α-Tocopherol bei Bacillus subtilis in chemisch definiertem Medium.
Die Wachstumskurven mehrerer Versuche im Biophotometer wurden umgezeichnet.
Gleichzeitige Zugabe von Antibiotikum und Antagonist zur Zeit A (vgl. 2.8.1.).
Inkubationstemperatur: 37° C

1: Kontrolle, sowie 143 µg α-Tocopherol/ml
2: 1,4 µg Asposterol und 143 µg α-Tocopherol/ml
3: " 71 "
4: " 14,3 "
5: Kontrolle mit 1,4 µg Asposterol/ml

3.4.4.2. Schizosaccharomyces pombe

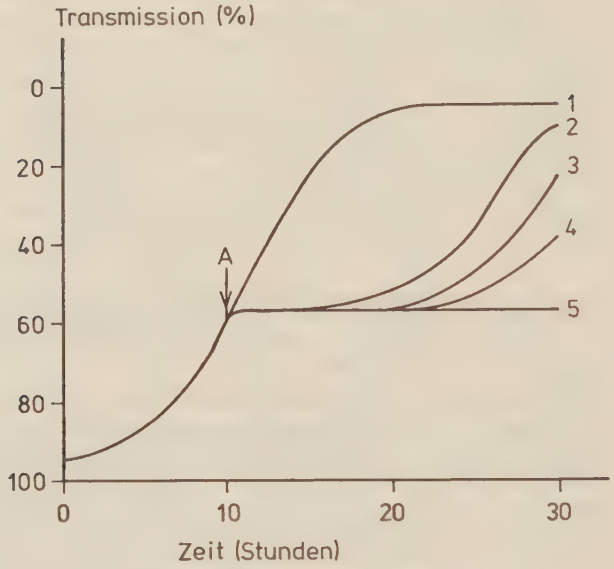

Abb. 16: Partielle Aufhebung der Hemmwirkung von Asposterol (fungizide Konzentration) durch α-Tocopherol bei Schizosaccharomyces pombe in chemisch definiertem Medium.
Die Wachstumskurven mehrerer Versuche im Biophotometer wurden umgezeichnet.
Gleichzeitige Zugabe von Antibiotikum und Antagonist zur Zeit A (vgl. 2.8.1.).
Inkubationstemperatur: 27° C

1: Kontrolle, sowie 143 µg α-Tocopherol/ml
2: 2,9 µg Asposterol und 143 µg α-Tocopherol/ml
3: " 71 "
4: " 14,3 "
5: Kontrolle mit 2,9 µg Asposterol/ml

3.4.5. Die Wirkung von Asposterol auf Protoplasten sensitiver Organismen

Bei Versuchen mit Protoplasten an Stelle von ganzen Zellen sind unmittelbare Wirkungen auf die Zellwand ausgeschlossen. Protoplasten von Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe wurden im jeweils geeigneten, osmotisch stabilisierenden Puffer suspendiert. Der Einfluß des Antibiotikums wurde im Biophotometer geprüft.

3.4.5.1. Bacillus subtilis

In Abbildung 17 ist die Wirkung von Asposterol auf Bacillus subtilis-Protoplasten dargestellt. Der Ansatz enthielt mehr als 95 % Protoplasten.

Aus den Abbildungen 12 und 17 geht hervor, daß unter vergleichbaren Bedingungen die lytische Wirkung des Asposterols bei Protoplasten schneller eintritt als bei vegetativen Zellen. Eine Verminderung der Zellzahl auf ein Zehntel, als Maß für die Lyse benutzt, wird bei vegetativen Zellen nach ungefähr vier Stunden, bei Protoplasten aber bereits nach knapp 60 Minuten erreicht.

3.4.5.2. Schizosaccharomyces pombe

Lysiert werden Schizosaccharomyces pombe-Protoplasten im Gegensatz zu Bacillus subtilis-Protoplasten nicht. Selbst 14 µg/ml Asposterol im Ansatz mit Hefeprotoplasten hatten während mehrerer Stunden keine erkennbare Wirkung. Mikroskopische Kontrollen ließen ebenfalls keine Abnahme des Protoplastentiters erkennen.

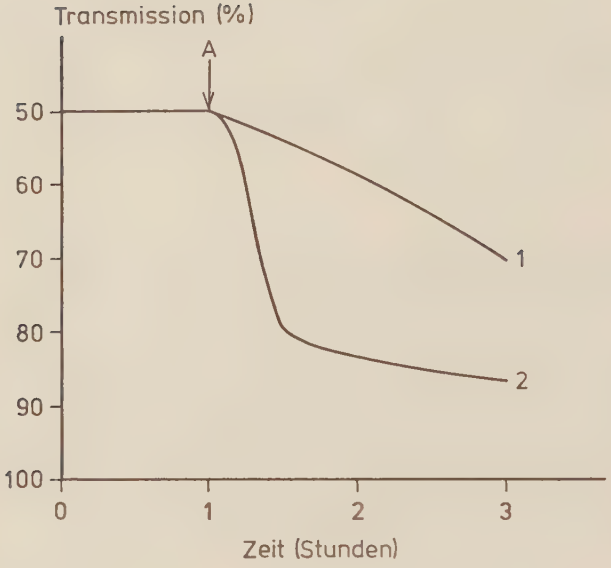

Abb. 17: Wirkung des Asposterols auf Bacillus subtilis-Protoplasten, Biophotometer-Versuch
Zusatz des Antibiotikums zur Zeit:
A: E_{546}= 0,250; 5,0 x 10^7 Protoplasten/ml
Inkubationstemperatur: 37° C
1: Kontrolle ohne Antibiotikum, mit 1,4 µl Äthanol/ml (A)
2: 1,4 µg Asposterol/ml (A)

3.5. Substanzen mit Asposterol-ähnlicher Wirkung

Ungesättigte Fettsäuren hemmen im Streifengradiententest (Tab. 10) das Wachstum von Bacillus subtilis. Die Toxizität nimmt etwa mit der Zahl der Doppelbindungen zu. Den deutlichsten Einfluß hatte Linolensäure. Deren Wirkung auf Bacillus subtilis wurde auch im Biophotometer gemessen. Sie äußert sich, wie die des Asposterols, in einem charakteristischen Kurvenverlauf (sehr ähnlich Abb. 12). Die minimale Hemmkonzentration in der log-Phase (Keim-Titer: 4×10^7) liegt bei 2 µg/ml. Eine Erhöhung der Linolensäure-Konzentration (7 µg/ml) hat, wie beim Asposterol, bakterizide Wirkung unter Lyse zur Folge. Der Antagonist des Asposterols, α-Tocopherol, hebt auch die Linolensäure-Wirkung einschließlich Lyse auf, und der Kurvenverlauf des Biophotometer-Versuchs entspricht Abbildung 15.

Die Ähnlichkeit von Asposterol und Linolensäure besteht vor allem in der lytischen Wirkung und der Aufhebbarkeit durch α-Tocopherol. Effekte der ungesättigten Fettsäuren werden folgendermaßen erklärt:

GAMAGE et al. (1971) beschreiben die Toxizität der Linolsäure für Escherichia coli. Wirksam sind dort die Oxydationsprodukte (Peroxide, Epoxide). Diese und andere Lipidperoxide können nach RECKNAGEL & GHOSHAL (1965) zum Zusammenbruch biologischer Membranen führen. Die Entstehung solcher Peroxide wird verhindert oder vermindert, wenn Antioxidantien wie das α-Tocopherol anwesend sind (GREEN 1970).

Fettsäuren, auch ungesättigte, werden freigesetzt durch die Wirkung der Phospholipase A auf Phosphoglyceride, von denen mindestens 90 % in der Cytoplasmamembran lokalisiert sind (THEISE 1973). Die anderen Reaktionsprodukte (Lysophosphoglyceride) erweisen sich ebenfalls

als toxisch, auch sie schädigen die Zellmembran (BISHOP 1971).

In diesem Zusammenhang wurde auch Undecen-(10)-säure (Undecylensäure) geprüft. Sie hemmt Bacillus subtilis und wird durch α-Tocopherol antagonisiert (Agardiffusionstest).

Undecylensäure ist die wirksame Komponente zahlreicher zur Lokaltherapie oberflächlicher Mykosen (z. B. "Fußpilz", eine Dermatophytose, Erreger: Trichophyton-Arten, Epidermophyton floccosum) eingesetzter Präparate. Im Stoffwechsel des menschlichen Organismus entsteht die ungewöhnliche (C_{11})-Säure mit einsetzender Pubertät. Sie wird durch die Kopfhaut ausgeschieden,womit beispielsweise die Spontanabheilung der Kindermikrosporie (eine Dermatophytose, Erreger: Microsporum canis, M. audouinii) erklärt wird (SCHOLEFIELD 1963).

3.6. Der Einfluß von Asposterol auf die Phospholipase A in vitro

Eine Beteiligung der Phospholipase A an der Wirkung des Asposterols wurde aus folgenden Gründen vermutet:

1. Da die Phosphoglyceride als Substrate der Phospholipase A vorwiegend in der Membran lokalisiert sind, muß auch das Enzym in enger räumlicher Beziehung dazu stehen.
2. Ungesättigte Fettsäuren beeinflussen die Enzymaktivität (GATT 1973).
3. Ungesättigte Fettsäuren ähneln dem Asposterol in ihrer Wirkung.

Geprüft wurde der Einfluß des Asposterols und seines Antagonisten auf die Aktivität der Phospholipase A (Tab. 13).

Tab. 13: Beeinflussung der Phospholipase A-Aktivität durch Asposterol und α-Tocopherol. Titrationswerte, angegeben als ml 0,002 N äthanolische NaOH

Ansatz	Reaktionszeit 3	6	10 Min.
Kontrolle ohne Enzym	-[1)]	-	0,01
Probe	0,67	1,08	1,66
Probe mit α-Tocopherol (250 µg/ml)	-	-	1,8
Probe mit Asposterol (25 µg/ml)	0,86	1,02	3,8
Probe mit Asposterol und α-Tocopherol (Konz. s. o.)	1,2	0,39	0,44

[1]) keine Probenahme

Abgesehen davon, daß der Versuchsansatz ein ungenügendes Modell der in vivo-Bedingungen (Zellmembran) sein muß, und daß auf Grund des Fehlens eingehenderer Untersuchungen zur Enzymwirkung einschließlich Sättigungskinetik quantitative Aussagen nur mit vielen Vorbehalten gemacht werden können, lassen sich aus Tabelle 13 einige auffallende Resultate ablesen:

1. Asposterol beeinflußt die Enzymaktivität,
2. α-Tocopherol allein hat keine Wirkung,
3. α-Tocopherol in Kombination mit Asposterol antagonisiert die Wirkung des Antibiotikums.

4. DISKUSSION

4.1. Vergleich von Asposterol mit anderen Steroid-Antibiotika

Die vorher aus Pilzen isolierten Steroid-Antibiotika besitzen kein einheitliches Wirkungsspektrum. Die antifungisch wirksamen Antibiotika Eburikosäure, Polyporensäuren und Viridan werden den rein antibakteriell wirksamen Verbindungen Fusidinsäure, Helvolsäure und den Cephalosporinen P_1-P_5 gegenübergestellt (HALLER & LOEFFLER 1969). Das Wirkungsspektrum des Asposterols umfaßt hingegen Pilze und Bakterien.

Auf Grund ihrer chemischen Struktur sind die antibakteriellen Steroid-Antibiotika untereinander enger verwandt als die antifungisch wirksamen Vertreter dieser Stoffklasse (TURNER 1971). Als Produzenten kommen zahlreiche Vertreter mehrerer, teilweise nicht näher verwandter Pilzgruppen in Frage. Innerhalb der Gattung Aspergillus kommt außer Asposterol aus A. microcysticus nur Helvolsäure vor, und zwar bei A. fumigatus mut. helvola (DAEHNE et al. 1968). Asposterol unterscheidet sich nicht nur durch Produzent und Wirkungsspektrum, sondern auch in der Summenformel ($C_{24}H_{33}NO_4$) von anderen Steroid-Antibiotika, die zudem keinen Stickstoff im Molekül enthalten.

Allerdings sind stickstoffhaltige Verbindungen mit Steroid-Grundgerüst (Alkaloide) aus höheren Pflanzen und Tieren bekannt (FIESER & FIESER 1968). Eine Identität mit Asposterol ist ebenfalls auf Grund der Summenformeln auszuschließen.

Die bisher zur Wirkungsweise des Asposterols durchgeführten Versuche können zur Unterscheidung von bekannten Steroid-Antibiotika herangezogen werden. Für

keines der übrigen Antibiotika wurde ein Eingriff an der Cytoplasmamembran nachgewiesen (GOTTLIEB & SHAW 1967). Fusidinsäure, das bestbekannte Steroid-Antibiotikum, hemmt die bakterielle Proteinsynthese in vivo und in vitro über die Translokation, indem die Ablösung deacylierter t-RNA von der P-Seite des Ribosoms verhindert wird (TANAKA et al. 1971; CARRASCO & VAZQUEZ 1973). Auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus der Helvolsäure und der Cephalosporine P weist die von EVANS & WATERWORTH (1966) beschriebene Kreuzresistenz mit Fusidinsäure hin. Veröffentlichungen zur Wirkungsweise antifungischer Steroid-Antibiotika wurden nicht gefunden.

4.2. Wirkort des Asposterols

Asposterol hemmt in geringen Konzentrationen die Vermehrung von Pro- und Eukaryonten. Bei je einem näher untersuchten Vertreter tritt die Hemmung in allen Wachstumsphasen ein. Insbesondere fällt auf, daß das Antibiotikum auch auf ruhende Zellen von Bacillus subtilis lysierend wirkt. Dies schließt zumindest für Bacillus subtilis eine primäre Wirkung auf Zellwand-, DNA- und Proteinsynthese aus und läßt einen Eingriff in die Membran vermuten (KUNZE et al. 1972).

Die Empfindlichkeit von Protoplasten sensitiver Organismen kann als weiterer Hinweis auf eine Membranwirkung gedeutet werden (KINSKY 1962). Tatsächlich sind Bacillus subtilis-Protoplasten hochempfindlich gegenüber Asposterol. Sie werden sofort lysiert, die von Schizosaccharomyces pombe jedoch überhaupt nicht. Dieses Ergebnis muß nicht unbedingt für eine abweichende Wirkung auf Eukaryonten sprechen. NICKERSON (1963) wies nach, daß verschiedene, nicht identifizierte Lipide als Konstruktionselemente in Zellwänden von Hefen vorhanden sind. Unter

Umständen wird das Antibiotikum von diesen Lipiden gebunden oder inaktiviert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müssten die im Ansatz enthaltenen Zellwandbruchstücke (Abb. 1) noch von den hochempfindlichen Protoplasten abgetrennt werden. Möglichkeiten, Protoplasten auf diese Weise anzureichern, wurden von PEBERDY & GIBSON (1971) aufgezeigt.

Antagonisten eines Antibiotikums ergeben ebenfalls oft Aufschlüsse über dessen Wirkort (PACHE & ZÄHNER 1969; HALDER & BOSE 1971). Als Antagonisten des Asposterols wurde das gut wirksame α-Tocopherol neben dem wesentlich schwächer antagonisierenden Lecithin gefunden. Während Lecithin bei Bakterien weitgehend fehlt (KATES 1966), wurde α-Tocopherol in den Membranen sehr vieler Organismen nachgewiesen (MARCUS & HAWLEY 1970). Verschiedene Fettsäuren, die in engem Zusammenhang mit der Funktion des α-Tocopherols stehen und beispielsweise die Wirkung des Boromycins (PACHE 1969) sowie der Lipomycine (KUNZE 1972) bei Bacillus subtilis aufheben, sind keine Antagonisten des Asposterols. So teilt Asposterol den Wirkort "Membran" mit anderen Antibiotika, zeigt aber wesentliche Besonderheiten (Tab. 11). Der wichtigste Asposterol-Antagonist, α-Tocopherol, hebt die Hemmung sowohl bei Bacillus subtilis (Prokaryont), als auch bei Schizosaccharomyces pombe (Eukaryont) auf. Die Funktion der Tocopherole (Vitamin E) ist noch weitgehend ungeklärt, doch gilt die cytoplasmatische Membran als nachgewiesener Wirkort (DeLUCA & SUTTIE 1970; NAIR & KAYDEN 1972).

Der Einfluß des Antibiotikums auf die Phospholipase A, die ja wegen ihrer Substrate (vgl. 3.6.) ein membrangebundenes Enzym sein muß, spricht in Übereinstimmung mit der Wirkung des Antagonisten α-Tocopherol ebenfalls für den Wirkort Membran. Einschränkend ist zu bemerken, daß die Abhängigkeit der Enzymwirkung von Asposterol und α-Tocopherol nur in orientierenden Versuchen in vitro

ermittelt worden ist.

Auch die Lyse von Bakterien läßt sich mit der Wirkung membranschädigender Substanzen erklären (SALTON 1968).

Um die Art und Weise von Eingriffen in Membranfunktionen zu charakterisieren, teilen GALE et al. (1972) Substanzen, die an der Cytoplasmamembran wirken, in drei Klassen ein (Tab. 14).

Tab. 14: Klassifizierung von Substanzen, welche an der Cytoplasmamembran angreifen (GALE et al. 1972)

1. Substanzen, welche zu Störungen des Membrangefüges führen:
Synthetische Detergentien
Tyrocidine, Gramicidin S
Phenole
Polymyxine, Circuline, Colistine
Polyene
2. Substanzen, welche spezifische Änderungen der Kationenpermeabilität hervorrufen:
Dinitrophenol
Salicylanilide und andere Desinfektionsmittel
Gramicidine A, B und C
Valinomycin, Enniatine
Makrotetrolide
Alamethicin
3. Substanzen, welche membrangebundene Enzyme des Energie-Transfers hemmen:
ATP-ase Hemmstoffe

Die bisher mit Asposterol ausgeführten Experimente ordnen das Antibiotikum der ersten Klasse der Tabelle 14 zu. Die meisten dort eingeordneten Stoffe besitzen detergentienartige Wirkung. Die Aufeinanderfolge mem-

branschädigender Einflüsse lytisch wirkender Substanzen (Detergentien) wurde von SALTON (1968) wie folgt postuliert:

1. Adsorption und Eindringen der Verbindung in die poröse Zellwand vor der eigentlichen Membranschädigung bei ganzen Zellen,
2. Wechselwirkung mit Lipid-Protein-Komplexen; Störungen des Membrangefüges,
3. Ausfluß niedermolekularer Metaboliten aus der Zelle,
4. Abbau von Proteinen und Nucleinsäuren,
5. als Folgereaktion an ganzen Zellen Abbau der Wand durch zelleigene Enzyme.

Bei der Lyse von Protoplasten fallen die Punkte 1 und 5 außer Betracht. Gegen eine detergentienartige Wirkung (Klasse 1, Tab. 14) von Asposterol im Sinne der Polymyxine (NEWTON 1956) bzw. synthetischer Detergentien spricht die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums. Sie liegt für Bacillus subtilis mit 0,3 µg/ml um mehr als zwei Zehnerpotenzen niedriger als die der Polymyxine (GOTTLIEB & SHAW 1967). Außerdem hat sich ein Polymyxin-resistenter Stamm von Escherichia coli (E. coli K 12 W 945 Po 8 H) als empfindlich gegenüber Asposterol erwiesen (3.4.1.). Die minimalen Hemmkonzentrationen der synthetischen Detergentien wiederum sind um einige Zehnerpotenzen höher als die der Polymyxine (PACHE 1969).

Nach ZÄHNER & MAAS (1972) ist allerdings zu beachten, daß mit steigender Konzentration eines Antibiotikums durchaus eine Änderung des Wirkmechanismus verknüpft sein kann. Lysierende Konzentrationen von Asposterol (Bacillus subtilis) sind nur geringfügig höher als die minimale Hemmkonzentration und außerdem wesentlich niedriger als die von Detergentien (vgl. Abb. 12 und 13). Die Wirkung selbst hoher Asposterol-Konzentrationen ist zudem, im Gegensatz zu Effekten verschiedener Detergen-

tien, reversibel. Sie wird durch α-Tocopherol aufgehoben. Wechselwirkungen zwischen Asposterol und α-Tocopherol außerhalb der Zelle konnten dadurch unwahrscheinlich gemacht werden, daß Asposterol vorweg zugegeben wurde (3.4.4.).

Die zum Teil widersprüchlichen Interpretationen der Funktion der Tocopherole (Vitamin E) sind bei DeLUCA & SUTTIE (1970) sowie NAIR & KAYDEN (1972) zusammengefaßt. Die Beobachtung, daß die Wirkung von Asposterol nicht nur in vivo (Bacillus subtilis und Schizosaccharomyces pombe), sondern auch in vitro (Phospholipase A) durch α-Tocopherol antagonisiert wird, kann deshalb Ausgangspunkt für weitere Versuche zur Wirkung des Asposterols, der Tocopherole, der ungesättigten Fettsäuren und ihrer Oxidationsprodukte sowie der Lysophosphoglyceride sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aspergillus microcysticus Sappa (Tü 502) bildet ein lipophiles Antibiotikum. Es wurde Asposterol genannt und unterscheidet sich von bekannten Antibiotika.

Das Antibiotikum konnte aus Submerskulturen des Produzenten in chemisch definierter Nährlösung mit Äthylacetat extrahiert und durch säulenchromatographische Fraktionierung an Kieselgel gereinigt werden.

Für Asposterol wurde die Summenformel $C_{24}H_{33}NO_4$ (MG: 399) ermittelt. Die Verbindung liegt in zwei Isomeren vor. Die Struktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt, alle chemisch-physikalischen Daten sprechen für ein Steran-Grundgerüst.

Asposterol hemmt das Wachstum von Bakterien und Pilzen. Die minimale Hemmkonzentration liegt für Bacillus subtilis bei 0,3 µg/ml, für Schizosaccharomyces pombe bei 1,2 µg/ml. Die Wirkungen des Antibiotikums auf beide Testorganismen werden durch α-Tocopherol antagonisiert.

Die toxischen Effekte verschiedener ungesättigter Fettsäuren wurden mit denen des Asposterols verglichen.

In vitro wurde eine noch näher zu untersuchende Beeinflussung der Phospholipase A gefunden.

Alle bisher ausgeführten Experimente zur Wirkungsweise des Antibiotikums machen im Gegensatz zu anderen Steroid-Antibiotika einen Angriff an der cytoplasmatischen Membran wahrscheinlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALDRIDGE, D. C. and W. B. TURNER: Two new mold metabolites related to avenaciolide. J. Chem. Soc. Sect. C Org. Chem. 13, 2431-2432 (1971)

AUDEN, J., J. GRUNER, J. NÜESCH and F. KNÜSEL: Some statistical methods in nutrient medium optimalisation. Pathol. Microbiol. 30, 858-866 (1967)

BARATHOVA, H., V. BETINA and P. NEMEC: Morphological changes induced in fungi by antibiotics. Folia Microbiol. 14, 475-483 (1969)

BECK, W.: Persönliche Mitteilung. Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1973)

BERGMEYER, H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Band II. Verlag Chemie: Weinheim/Bergstr. (1970)

BISHOP, D. G.: Lipid Metabolism. In: A. R. Johnson and J. B. Davenport, Biochemistry and Methodology of Lipids. Wiley-Interscience: New York - London - Sydney - Toronto (1971)

BISHOP, D. G., L. RUTBERG and B. SAMUELSSON: The chemical composition of the cytoplasmic membrane of Bacillus subtilis. Eur. J. Biochem. 2, 448-453 (1967)

BLINC, M. and V. JOHANIDES: Antibiotics from aspergilli with special regard to species isolated in Yugoslavia. Bull. Sci. Cons. Acad. RSF Yougosl. 2, 99-100 (1956)

BROWN, A. G.: Versimide, a metabolite of Aspergillus versicolor. J. Chem. Soc. Sect. C Org. Chem. 18, 2572-2573 (1970)

CARRASCO, L. and D. VAZQUEZ: Ribosomal sites involved in binding of aminoacyl-t RNA and EF 2. Mode of action of fusidic acid. FEBS Lett. 32, 152-156 (1973)

COOPER, C. M., G. A. FERNSTROM and S. A. MILLER: Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36, 504-509 (1944)

DAEHNE, W. von, H. LORCH and W. O. GODTFREDSEN: Microbiological transformations of fusidane-type antibiotics. A correlation between fusidic acid and helvolic acid. Tetrahedron Lett. 47, 4843-4846 (1968)

DAVIS, B. D. and E. S. MINGIOLI: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)

DeLUCA, H. F. and J. W. SUTTIE: The fat-soluble vitamins. The University of Wisconsin Press: Madison, Milwaukee and London (1970)

DRAUTZ, H.: Persönliche Mitteilung. Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1973)

DREWS, G.: Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1968)

ELLESTAD, G. A., M. P. KUNSTMAN, P. MIRANDO and G. O. MORTON: Structures of fungal diterpene antibiotics, LL-S-491 ß and γ. J. Am. Chem. Soc. 94, 6206-6210 (1972)

EVANS, R. J. and P. M. WATERWORTH: Naturally-occuring fusidic acid resistance in staphylococci and its linkage to other resistances. J. Clin. Pathol. 19, 555-560 (1966)

FIESER, L. F. und M. FIESER: Organische Chemie. Verlag Chemie: Weinheim/Bergstr. (1968)

FINDLAY, J. A. and L. RADICS: Flavipucine, an antibiotic from Aspergillus flavipes. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 1972, 2071-2074 (1972)

FOLCH, J., M. LEES and G. H. S. STANLEY: A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)

GALE, E. F., E. CUNDLIFFE, P. E. REYNOLDS, M. H. RICHMOND and M. J. WARING: The molecular basis of antibiotic action. John Wiley & Sons: London, New York, Sydney, Toronto (1972)

GAMAGE, P. T., T. MORI and S. MATSUSHITA: Effects of linoleic acid hydroperoxides and their secondary products on the growth of Escherichia coli. Agr. Biol. Chem. 35, 33-39 (1971)

GATT, S.: Inhibitors of enzymes of phospholipid and sphingolipid metabolism. In: R. M. Hochster, M. Kates and J. H. Quastel, Metabolic Inhibitors. A Comprehensive Treatise. Vol. IV. Academic Press: New York, London (1973)

GAUNT, J. K. and B. B. STOWE: Analysis and distribution of tocopherols and quinones in the pea plant. Plant Physiol. 42, 851-858 (1967)

GOTTLIEB, D. and P. D. SHAW: Antibiotics I. Mechanism of action. Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1967)

GREEN, J.: Vitamin E and the biological antioxidant theorie. In: H. F. DeLuca and J. W. Suttie, The fat-soluble vitamins. The University of Wisconsin Press: Madison, Milwaukee, London (1970)

HALDER, A. and S. K. BOSE: Reversal of mycobacillin inhibition reactions by sterols and phospholipids. J. Antibiotics 24, 779-784 (1971)

HALLER, B. und W. LOEFFLER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 71. Mitteilung: Fusidinsäure aus Dermatophyten und anderen Pilzen. Arch. Mikrobiol. 65, 181-194 (1969)

HASENBÖHLER, A.: Optimalisierung der Antibioticabildung bei einem Streptomyceten. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1971)

HEBERLE, W.: Die Antibiotica der Gattung Aspergillus und Isolierung eines Antibioticums aus Aspergillus microcysticus. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1972)

HESSE, G.: Chromatographisches Praktikum. In: F. Hecht, R. Kaiser, H. Kriegsmann und W. Simon, Methoden der Analyse in der Chemie. Band 6. Akademische Verlagsgesellschaft: Frankfurt am Main (1968)

HÜTTER, R., W. KELLER-SCHIERLEIN, J. NÜESCH und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1965)

HÜTTLIN, H.: Isolierung und Charakterisierung eines membranophilen Antibiotikums aus Streptomyces violaceoniger. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1972)

HULS, R., J. RAMAUT and R. HUVELLE: Observations on a culture of Aspergillus giganteus Wehmer, from the Irsac Collection. Bull. cl. sci. Acad. r. Belg. 48, 494-501 (1957)

HUMMEL, B. C. W.: Isolation and partial characterization of flavicidic acid, phytotoxic metabolite of Aspergillus flavus. Diss. Abstr. 16, 1332-1333 (1956)

JOHNSON, A. R. and J. B. DAVENPORT: Biochemistry and Methodology of Lipids. Wiley-Interscience: New York, London, Sydney, Toronto (1971)

KAGE, M. P.: Visualisierung des Unsichtbaren. Bild Wiss. 10, 502-511 (1973)

KATES, M.: Biosynthesis of lipids in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 20, 13-44 (1966)

KINSKY, S. C.: Effect of polyene antibiotics on protoplasts of Neurospora crassa. J. Bacteriol. 83, 351-358 (1962)

KINSKY, S. C.: Polyene antibiotics. In: D. Gottlieb and P. D. Shaw, Antibiotics I. Mechanism of action. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1967)

KUNZE, B.: Lipomycin, ein polyenartiges, antibakteriell wirkendes Antibiotikum. Untersuchungen zur biologischen Wirkung. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1972)

KUNZE, B., K. SCHABACHER, H. ZÄHNER und A. ZEECK: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 111. Mitteilung: Lipomycine. I. Isolierung, Charakterisierung und erste Untersuchungen zur Konstitution und Wirkungsweise. Arch. Mikrobiol. 86, 147-174 (1972)

PEBERDY, J. F. and R. K. GIBSON: Regeneration of Aspergillus nidulans protoplasts. J. Gen. Microbiol. 69, 325-330 (1971)

PFEFFERLE, R.: Ophiocordin, ein Antibiotikum des Pilzes Cordyceps ophioglossoides. Isolierung und Eigenschaften. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1972)

PORALLA, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1967)

RAISTRICK, H. and P. RUDMAN: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 97. Flavipin, a crystalline metabolite of Aspergillus flavipes (Bainier a. Sartory) Thom a. Church and Aspergillus terreus Thom. Biochem. J. 63, 395-405 (1956)

RAPER, K. B. and D. I. FENNELL: The Genus Aspergillus. The Williams & Wilkins Company: Baltimore (1965)

RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch. Springer-Verlag: Berlin, Göttingen, Heidelberg (1964)

RECKNAGEL, R. O. and A. K. GHOSHAL: No accelerated mobilization of peripheral lipid in CCl_4 hepatotoxicity. Gastroenterology 48, 509-510 (1965)

SALTON, M. R. J.: Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability. J. Gen. Physiol. 52, 227-252 (1968)

SANCHEZ, J. L.: Acción antibiótica del Aspergillus flavus sobre el Phytophthora infestans. Bol. Exptl. Agropec., Lima 5, 24-28 (1956)

SCHINDLER, P.: Untersuchungen zur Kinetik der Chlorothricinwirkung auf die Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1). Dissertation Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1973)

SCHOLEFIELD, P. G.: Fatty acids and their analogues. In: R. M. Hochster and J. H. Quastel, Metabolic Inhibitors. A Comprehensive Treatise. Vol. I. Academic Press: New York, London (1963)

SOKOLOV, L. B., L. A. ALEKSEEVA, N. V. IVANOVA, V. O. KULBACH, N. A. KUZNETSOVA and V. S. NYN: (A study of Asperginon, a new pigment metabolite of Aspergillus sp.). Antibiotiki 17, 745-750 (1972)

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1967)

TAMURA, S., S. KUYAMA, Y. KODAIRA and S. HIGASHIKAWA: The structure of Destruxin B, a toxic metabolite of Oospora destructor. Agric. Biol. Chem. 28, 137-138 (1964)

TANAKA, N., Y.-C. LIN and A. OKUYAMA: Studies on translocation of F-Met-t RNA and Peptidyl-t RNA with antibiotics. Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 477-483 (1971)

TEDESCHI, G. G.: Antiprotozoic activity of the pigments of Aspergillus niger. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 24, 923-924 (1948)

THEISE, H.: Lipide. In: H. Bielka, Molekulare Biologie der Zelle. G. Fischer Verlag: Stuttgart (1973)

TURNER, W. B.: Fungal Metabolites. Academic Press: London and New York (1971)

WAHL, J.: Protoplasten von mycelbildenden Pilzen. Diplomarbeit Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1973)

WEIBULL, C.: The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bacteriol. 66, 688-695 (1953)

WELLS, M. A. and D. J. HANAHAN: Phospholipase A from Crotalus adamanteus Venom. In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology. Vol. XIV. Lipids. Academic Press: New York and London (1969)

WILLIAMS, D. H. und I. FLEMING: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme Verlag: Stuttgart (1968)

WOLF, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30 S-Untereinheit. Dissertation Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen (1971)

ZÄHNER, H. and W. K. MAAS: Biology of Antibiotics. Springer-Verlag: New York, Heidelberg, Berlin (1972)

Lebenslauf

Am 31.3.1945 wurde ich als Sohn des Regierungsamtmanns Franz Heberle und seiner Ehefrau Helene, geb. Herz, in Schwäbisch Gmünd geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule, von 1956 an die Oberschule und legte am 10.3.1966 am Schickhardt-Gymnasium in Stuttgart das Abitur ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Universität Stuttgart das Studium der Biologie (Diplomvorprüfung: 15.10.1968). Nach sechs Semestern wechselte ich an die Universität Tübingen über, wo ich im Frühjahr 1972 die Diplomhauptprüfung mit dem Hauptfach Mikrobiologie, den Nebenfächern Biochemie, Organische Chemie, Pharmakologie und einer experimentellen Arbeit "Die Antibiotica der Gattung Aspergillus und Isolierung eines Antibioticums aus Aspergillus microcysticus" bestand.

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Biologie der Universität Tübingen, im Lehrbereich Mikrobiologie I, unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler in der Zeit von April 1972 bis Januar 1974 ausgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Stuttgart: A. Arnold, H. Bredereck, J. Goubeau, J. Grim, T. Haag, K. Jeremias, A. Kleinschmidt, H. Kneser, H. Krebs, E. Möhn, O. Pflugfelder, H. Pick, A. Wagner und H. Wermuth.

In Tübingen : E. Bayer, M. Bühler, H. Diekmann, R. Engelhorn, W. Frank, A. Gottschalk, J. Guglielmi, H. Kneifel, W. Kraus, W. Loeffler, H. Machleidt, H. Pape, H. Remmer, W. Rundel, E. Sander, W. Seyffert, H. Suhr, H. Uehleke, G. Weitzel, U. Weser, D. Winne und H. Zähner.